



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

---

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ  
ΚΑΛΡΕΤΙΚΟΥΛΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ 14-3-3 ΣΕ  
ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΕΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΠΜΣ ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ**

της φοιτήτριας

**Φιλιάς Μαρινέλη**

*Αθήνα*

*17 Ιανουαρίου 2017*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
SUMMARY.....	8

### ΜΕΡΟΣ Ι

ΜΕΡΟΣ Ι: ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΝΕΦΡΟΣ.....	9
1.1 Ο ρόλος του νεφρού.....	9
1.2 Ανατομία-ιστολογία του νεφρού.....	9
ΜΕΡΟΣ Ι: ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ.....	15
2.1 Ορισμός Χρόνιας Νεφρικής Νόσου.....	15
2.2 Ταξινόμηση Χρόνιας Νεφρικής Νόσου.....	15
2.3 Επιδημιολογικά δεδομένα Χρόνιας Νεφρικής Νόσου.....	15
2.4 Αίτια Χρόνιας Νεφρικής Νόσου.....	16
2.5 Παθοφυσιολογία της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου.....	17
2.6 Κλινικά και Εργαστηριακά χαρακτηριστικά της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου.....	18
2.7 Ασυμπτωματική πρωτεϊνουρία.....	18
2.8 Νεφρωσικό σύνδρομο.....	19
2.9 Νεφριτιδικό σύνδρομο.....	20
ΜΕΡΟΣ Ι: ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΝΕΦΡΙΚΗ ΙΝΩΣΗ.....	22
3.1 Ορισμός νεφρικής ίνωσης.....	22
3.2 Διαμεσολαβούμενοι μοριακοί μηχανισμοί και σηματοδοτικά μονοπάτια στην νεφρική ίνωση.....	23
3.2.1 Ο ρόλος των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών.....	23
3.2.2 Ο ρόλος της εξωκυττάριας ουσίας.....	25
3.3.3 Ο ρόλος των φλεγμονωδών κυττάρων.....	26
3.3.4 Ο ρόλος των περικυττάρων στην νεφρική ίνωση .....	27
3.3.5 Ο ρόλος των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων.....	31

## ΜΕΡΟΣ Ι: ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΝΕΦΡΙΤΙΔΕΣ

4.1	IgA νεφροπάθεια .....	33
4.1.1	Ορισμός.....	33
4.1.2	Παθοφυσιολογία της IgA νεφροπάθειας.....	33
4.1.3	Κλινική πορεία ασθενών με IgA νεφροπάθεια.....	34
4.1.4	Κλινική εικόνα και διάγνωση της IgA νεφροπάθειας.....	34
4.1.5	Ταξινόμηση της IgA νεφροπάθειας.....	35
4.2	Μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα.....	36
4.2.1	Ορισμός.....	36
4.2.2	Παθοφυσιολογία της μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας .....	37
4.2.3	Κλινική πορεία ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα.....	39
4.2.4	Κλινική εικόνα και διάγνωση της μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας.....	39
4.3	Νεφρίτιδα του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου.....	40
4.3.1	Ορισμός.....	40
4.3.2	Παθοφυσιολογία και παθολογοανατομική εικόνα της νεφρίτιδας του ΣΕΛ...	40
4.3.3	Κλινική πορεία των ασθενών με νεφρίτιδα του ΣΕΛ.....	43
4.3.4	Κλινική εικόνα και διάγνωση της νεφρίτιδας του ΣΕΛ.....	43
4.4	Σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας.....	44
4.4.1	Ορισμός.....	44
4.4.2	Παθοφυσιολογία και ιστολογική εικόνα των σπειραματονεφρίτιδων στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας.....	44
4.4.3	Κλινική πορεία των ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας.....	45
4.4.4	Κλινική εικόνα και διάγνωση των σπειραματονεφρίτιδων στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας.....	45
4.4.5	Προτεινόμενη ταξινόμηση των σπειραματονεφρίτιδων στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας.....	46

## ΜΕΡΟΣ Ι: ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ 14-3-3

5.1	Τι είναι οι πρωτεΐνες 14-3-3;.....	48
5.2	Δομή πρωτεϊνών 14-3-3.....	48

5.3	Μηχανισμός δράσης πρωτεϊνών 14-3-3.....	49
5.3.1	Δομική τροποποίηση του πρωτεϊνικού στόχου.....	51
5.3.2	Παρεμπόδιση δομικών αλληλουχιών του πρωτεϊνικού στόχου.....	51
5.3.2.1	Επικάλυψη θέσεων αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με πρωτεΐνη.....	51
5.3.2.2	Επικάλυψη θέσεων αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με DNA.....	52
5.3.2.3	Παρεμπόδιση αποφωσφορυλίωσης ή πρωτεόλυσης του πρωτεϊνικού στόχου	
5.3.3	«Μοριακή πλατφόρμα» για γεινίαση πρωτεϊνών.....	52
5.4	Λειτουργίες πρωτεϊνών 14-3-3.....	52
5.5	Ο ρόλος των πρωτεϊνών 14-3-3 στην κυτταρική ανάπτυξη, επιβίωση και διαφοροποίηση.....	53
5.6	Ο ρόλος των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νόσους.....	57

#### ΜΕΡΟΣ I: ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

6.1	Ζωικά μοντέλα ίνωσης.....	59
-----	---------------------------	----

### ΜΕΡΟΣ II

#### ΜΕΡΟΣ II: ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....

#### ΜΕΡΟΣ II: ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1	Ζωικά μοντέλα νεφρική ίνωσης.....	68
2.2	Ανοσοϊστοχημεία νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε ποντίκι .....	69
2.3	Ανοσοϊστοχημεία νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε βιοψίες ανθρώπινου νεφρικού ιστού.....	70
2.4	Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων ανοσοϊστοχημείας νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε βιοψίες ανθρώπινου νεφρικού ιστού.....	70
2.5	Ανοσοφθορισμός νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε ποντίκι.....	71
2.6	Ανοσοφθορισμός νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε βιοψίες ανθρώπινου νεφρικού ιστού.....	72
2.7	Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων ανοσοφθορισμού νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε ποντίκι.....	72
2.8	Κλινικά δεδομένα.....	72

#### ΜΕΡΟΣ II: ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1	Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε ποντίκι.....	74
-----	--	----

3.2	Ανοσοφθορισμός των πρωτεϊνών 14-3-3 και της καλρετικουλίνης στο νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε ποντίκι.....	79
3.3	Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών.....	81
3.3.1	Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με καρκίνο νεφρού (ομάδα ελέγχου).....	81
3.3.2	Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με IgA νεφροπάθεια.....	82
3.3.3	Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα.....	85
3.3.4	Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με νεφρίτιδα του ΣΕΛ.....	87
3.3.5	Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας.....	89
3.4	Ανοσοφθορισμός των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών.....	90
3.5	Αξιολόγηση κλινικών δεδομένων και συσχέτισή τους με τα ευρήματα από την ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημείας στους ασθενείς.....	93
	ΜΕΡΟΣ II: ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	95
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	101

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Α. Χαρώνη για την εμπιστοσύνη αυτής της μελέτης και την υποστήριξη καθ' όλη της διάρκειά της, τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς μου επιτροπής την Καθηγήτρια κ. Ε. Κιτράκη και τον Ερευνητή κ. Π. Πολίτη, την υποψήφια διδάκτορα κ Μυρτώ Ρίζου για την πολύτιμη βοήθειά της καθώς και όλους όσους μου συμπαραστάθηκαν κατά τη διάρκειά της, συμπεριλαμβανομένων των συναδέλφων μου και της οικογένειάς μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος (ΧΝΝ) αποτελεί ένα νόσημα που προσβάλλει ένα μεγάλο μέρος πληθυσμού παγκοσμίως, αποτελώντας σημαντική αιτία θνητότητας στον κόσμο. Βασικό της γνώρισμα αποτελεί η νεφρική ίνωση. Από μελέτες Πρωτεωμικής Ανάλυσης φάνηκε ότι σε κύτταρα στα οποία υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη καλρετικουλίνη, αλλάζει και η έκφραση άλλων πρωτεϊνών, όπως οι πρωτεΐνες της οικογένειας 14-3-3. Στην παρούσα μελέτη, έγινε διερεύνηση της έκφρασης της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών, αρχικά στο ζωικό μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα (UUO) και στην συνέχεια σε βιοψίες ασθενών με σπειραματοπάθειες (IgA νεφροπάθεια, μεμβρανώδη νεφροπάθεια, νεφρίτιδα του συστηματικού ερυθρεματοςώδη λύκου και νεφροπάθεια σχετιζόμενη με ANCA αγγειίτιδες) και επιχειρήθηκε συσχετισμός των ευρημάτων με τα κλινικά δεδομένα από το ιστορικό αυτών των ασθενών. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ανοσοϊστοχημεία και ο ανοσοφθορισμός. Αρχικά, φάνηκε ότι η έκφραση των 14-3-3 αυξάνεται στα ζώα με απολίνωση του ουρητήρα συγκριτικά με τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Στις σπειραματοπάθειες παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης τους, η οποία μάλιστα διέφερε ανάμεσα στις παθήσεις. Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των 14-3-3 ήταν εντονότερη στα σωληνάρια και συγκεκριμένα στα άπω σωληνάρια σε σχέση με τα εγγύς. Με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού μελετήθηκε και η καλρετικουλίνη, η έκφραση της οποίας φαίνεται να ακολουθεί την έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3. Συμπερασματικά, φαίνεται πως η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 καθώς και της καλρετικουλίνης αυξάνονται κατά την διαδικασία ανάπτυξης της ίνωσης, γεγονός που υποδεικνύει ότι θα μπορούσαν να αποτελέσουν πρώιμο δείκτη διάγνωσης της χρόνιας νεφρικής νόσου.

## SUMMARY

Chronic kidney disease (CKD) is a disease that affect a large number of patients and is considered a leading cause of morbidity and mortality worldwide. The common feature of CKD is renal fibrosis. From previous studies using Proteomic Analysis, it has been demonstrated that in cells, in which calreticulin is up-regulated, expression of other proteins, like the family proteins 14-3-3, were also affected. In this study, we examine the expression of the family of proteins 14-3-3, firstly in the unilateral ureteric obstruction (UUO) rat model, and secondly in biopsies of patients with glomerulonephritis (IgA nephritis, membranous nephropathy, lupus nephritis, ANCA-associated glomerulonephritis) and finally we attempt to find a correlation between the findings and the clinical data of patients. We used immunohistochemistry and immunofluorescence as our methods of study. Firstly, we have demonstrated that expression of 14-3-3 proteins is up-regulated in animals with ureteral obstruction, compared to control animals. As concerned glomerulonephritis, we demonstrate the up-regulation of 14-3-3 proteins, but we also observed a different expression of 14-3-3. It has been, also, demonstrated that expression of 14-3-3 is more important in tubules and especially in distal tubules. As concerned immunofluorescence, we examine also calreticulin, which has been showed to follow the expression of 14-3-3. In summary, our findings establish that 14-3-3 proteins and calreticulin are up-regulated during the process of renal fibrosis and that these proteins could become an early marker for diagnosis of CKD.



## ΜΕΡΟΣ Ι: ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

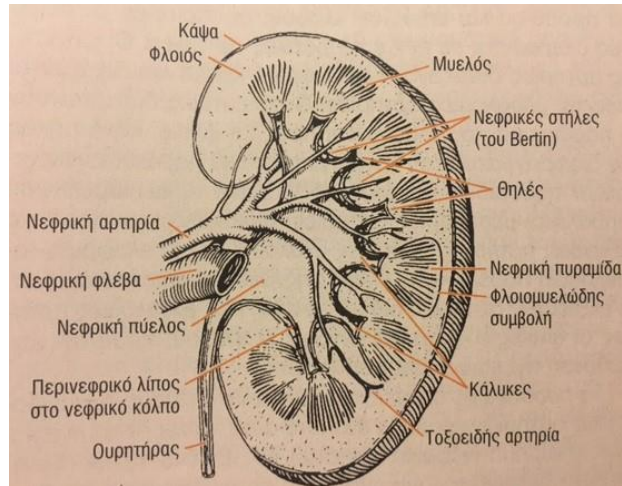
### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΝΕΦΡΟΣ

#### 1. Ρόλος του νεφρού

Η σύνθετη φύση του νεφρού αντικατοπτρίζει και την πολύπλοκη λειτουργία του. Το όργανο αυτό ευθύνεται για τη διατήρηση τόσο του όγκου, όσο και της ιοντικής σύνθεσης των υγρών του σώματος, απεκκρίνοντας μη πτητικά, άχρηστα μεταβολικά προϊόντα, όπως η κρεατινίνη, η ουρία και το ουρικό οξύ, αλλά και αποβάλλοντας εξωγενή φάρμακα και τοξίνες. Ο νεφρός, παράλληλα, αποτελεί ένα μείζον ενδοκρινικό όργανο, δεδομένου ότι παράγει ρενίνη, ερυθροποιητίνη, 1,25-διυδροξυχοληκαλσιφερόλη, προσταγλανδίνες και κινίνες, ενώ αποτελεί και όργανο στόχος για πολλές ορμόνες. Ο νεφρός, επίσης, καταβολίζει πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους και ευθύνεται για ένα πλήθος μεταβολικών λειτουργιών, όπως π.χ. για την αμμωνιογένεση και τη γλυκονεογένεση(1).

#### 2. Ανατομία- Ιστολογία νεφρού

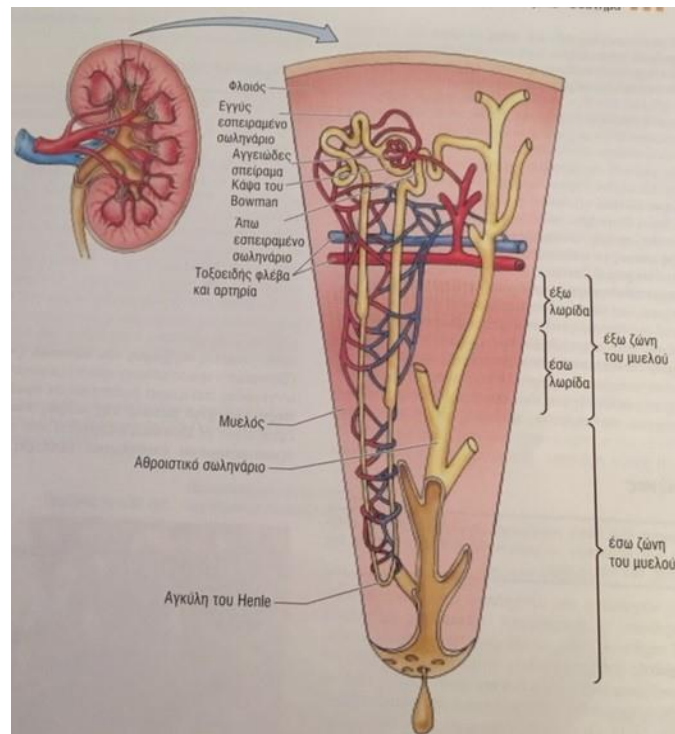
Οι νεφροί είναι οπισθοπεριτοναϊκά όργανα, μήκους 11-14 εκατοστά, που βρίσκονται εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης, της αορτής και της κάτω κοίλης φλέβας, στο ύψος που αντιστοιχεί στον 12<sup>ο</sup> θωρακικό έως 3<sup>ο</sup> οσφυϊκό σπόνδυλο. Ο νεφρός διαιρείται σε φλοιό και μυελό. Η φλοιώδης μοίρα είναι καστανόχρωμη και κοκκιώδης, ενώ ο μυελός αποτελείται από 6 έως 12 ξεχωριστές, πυραμοειδείς, λευκωπές γραμμωτές περιοχές, τις νεφρικές πυραμίδες. Η βάση κάθε πυραμίδας είναι στραμμένη προς τον φλοιό, ενώ η κορυφή της, γνωστή ως νεφρική θηλή, είναι στραμμένη προς την πύλη (εικόνα 1)(2).



**Εικόνα 1: Ανατομία του νεφρού. Από βιβλιογραφική αναφορά (2).**

Η μικρότερη ανατομική μονάδα του νεφρού είναι ο νεφρώνας, απαρτιζόμενος από το νεφρικό σωματίο ή σωματίο Bowman ή σπείραμα και το ουροφόρο σωληνάριο. Η δομή τόσο των σπειραμάτων όσο και των ουροφόρων σωληναρίων επιτρέπει την επιτέλεση των βασικών λειτουργιών του νεφρού που είναι η διήθηση για το σωματίο του Bowman και η επαναρρόφηση και απέκκριση ουσιών για το σωληνάριο. Κάθε ανθρώπινος νεφρός απαρτίζεται από 1 έως 1,3 εκατομμύρια νεφρώνες. Το σωληναριακό τμήμα του νεφρώνα αρχίζει με το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο ως συνέχεια της κάψας του Bowman και συνεχίζει σχηματίζοντας την αγκύλη του Henle (λεπτό κατιόν σκέλος, αγκύλη, παχύ ανιόν σκέλος), μετά το άπω εσπειραμένο και καταλήγει στο αθροιστικό σωληνάριο. Σε κάθε αθροιστικό σωληνάριο εκβάλλουν περισσότεροι του ενός νεφρώνες. Η συνένωση πολλών αθροιστικών σωληναρίων οδηγεί τον σχηματισμό ευρύτερων ουροφόρων σωληναρίων, τα οποία εκβάλλουν μέσω των νεφρικών θηλών στην πύελο(2).

Υπάρχουν 2 τύποι νεφρώνων στον ανθρώπινο νεφρό: οι βραχύτεροι φλοιώδεις νεφρώνες (cortical nephrons) και οι επιμηκέστεροι παραμυελικοί νεφρώνες (juxtamedullary nephrons), των οποίων τα νεφρικά σωματία εντοπίζονται στον φλοιό, ενώ τα σωληνώδη τμήματά τους εντοπίζονται στον μυελό. Κάθε παραμυελικός νεφρώνας έχει μήκος περίπου 40mm. Κάθε επιμέρους τμήμα του νεφρώνα επιτελεί ειδικές φυσιολογικές λειτουργίες. Το σπείραμα, ή νεφρικό σωματίο, διηθεί το υγρό που εκρέει από την κυκλοφορία του αίματος. Τα επόμενα σωληνώδη τμήματα του νεφρώνα, δηλαδή το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, τα λεπτά σκέλη της αγκύλης του Henle και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο, τροποποιούν το διήθημα σχηματίζοντας τα ούρα (εικόνα 2)(2).



**Εικόνα 2: Δομή του νεφρώνα.** Απεικονίζονται το νεφρικό σωματίο ή σπείραμα και το ουροφόρο σωληνάριο, με το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, στην συνέχεια την αγκύλη του Henle (λεπτό κατιόν σκέλος, αγκύλη, παχύ ανιόν σκέλος), το άπω εσπειραμένο και τέλος το αθροιστικό σωληνάριο. Από βιβλιογραφική αναφορά (2).

**Νεφρικό σωματίο:** Αποτελείται από ένα θύσανο τριχοειδών, το αγγειώδες σπείραμα (glomerulus), το οποίο περικλείεται από την κάψα του Bowman, το διευρυμένο και εγκοιλπωμένο εγγύς άκρο του νεφρώνα. Ο χώρος στο εσωτερικό της κάψας του Bowman είναι γνωστός ως χώρος του Bowman ή ουρικός χώρος. Το αγγειώδες σπείραμα βρίσκεται σε επαφή με το περισπλάχνιο πέταλο της κάψας του Bowman που αποτελείται από τροποποιημένα επιθηλιακά κύτταρα αποκαλούμενα ποδοκύτταρα (podocytes)(2).

**Αγγειώδες σπείραμα:** Αποτελείται από θυσάνους αναστομούμενων τριχοειδών αγγείων, τα οποία εκφύονται από κλάδους του προσαγωγού αρτηριδίου. Ο αγγειώδης σπειραματικός θύσανος περιλαμβάνει τρία είδη εξειδικευμένων κυττάρων, τη βασική μεμβράνη και μία θεμέλιο ουσία, το μεσάγγειο. Τα εξειδικευμένα κύτταρα περιλαμβάνουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα που πλαισιώνουν τον αυλό των τριχοειδών, τα μεσαγγειακά κύτταρα που εντοπίζονται στην κεντρολοβιακή περιοχή του σπειραματικού θυσάνου και τα σπλαχνικά επιθηλιακά κύτταρα τα οποία εδράζονται στην εξωτερική επιφάνεια των τριχοειδών. Ένας τέταρτος τύπος κυττάρων, τα

τοιχωματικά επιθηλιακά κύτταρα, πλαισιώνουν το έλυτρο του Bowman. Ο χώρος του Bowman, που καλείται και «ουροφόρος κοιλότητα» αντιπροσωπεύει το διάστημα μεταξύ των σπλαχνικών επιθηλιακών κυττάρων και της τοιχωματικής επιθηλιακής στιβάδας που καλύπτει το έλυτρο του Bowman. Μεταξύ του αίματος και της ουροφόρου κοιλότητας σχηματίζεται ένας διηθητικός φραγμός από το θυριδωτό επιθήλιο, την περιφερική σπειραματική βασική μεμβράνη και τα υπερκείμενα σπλαχνικά επιθηλιακά κύτταρα. Η σπειραματική βασική μεμβράνη (ΣΒΜ) είναι μία ένυδρη γέλη, η οποία περιέχει διασταυρούμενα μόρια που σχηματίζουν ένα σύνθετο τρισδιάστατο δικτυωτό πλέγμα. Η ΣΒΜ αποτελεί έναν εκλεκτικό ως προς το μέγεθος και το φορτίο φραγμό στη δίοδο μακρομορίων(1).

**Εγγύς ουροφόρο σωληνάριο:** Το εγγύς ουροφόρο σωληνάριο περιλαμβάνει ένα αρχικό εσπειραμένο τμήμα, την εσπειραμένη μοίρα, που εντοπίζεται στο φλοιώδη λαβύρινθο, και ένα ευθύ τμήμα, την ευθεία μοίρα, που βρίσκεται στη μυελώδη ακτίνα. Τα κύτταρα του εγγύς σωληναρίου είναι κυλινδρικά και εμφανίζουν χαρακτηριστική ψηκτροειδή παρυφή. Οι πλαγιοβασικές κυτταρικές μεμβράνες είναι εξαιρετικά ενισχυμένες λόγω εκτεταμένων δακτυλιοειδών συναρμογών των βασικών και πλαγίων κυτταροπλασματικών αποφύσεων μεταξύ γειτονικών κυττάρων. Η εντόπιση της  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPάσης}$  στις πλάγιοβασικές μεμβράνες είναι υπεύθυνη για την ενεργητική μεταφορά του νατρίου, διαδικασία που αποτελεί και το βασικό χαρακτηριστικό αυτού του σωληναριακού τμήματος. Το εγγύς ουροφόρο σωληνάριο αποτελεί το πρώτο τμήμα του νεφρώνα που τροποποιεί τον όγκο και την ιοντική σύνθεση του σπειραματικού υπερδιηθήματος. Μέσω ισοσμοτικής επαναρρόφησης υγρού, ο όγκος του υγρού μειώνεται κατά 60% υπό φυσιολογικές συνθήκες. Εκτός από την επαναρρόφηση νατρίου, το εγγύς ουροφόρο σωληνάριο είναι υπεύθυνο και για την επαναρρόφηση γλυκόζης, αμινοξέων, κιτρικού, γαλακτικού, οξικού και φωσφορικού, καθώς επίσης αποτελεί σημαντική θέση αμμωνιογένεσης. Τέλος, το εγγύς ουροφόρο σωληνάριο είναι υπεύθυνο και για την απέκκριση διαφόρων ουσιών (κατιόντων και ανιόντων οργανικών άχρηστων προϊόντων) και φαρμάκων(1).

**Σκέλη της αγκύλης του Henle:** Μετά το τελικό άκρο του εγγύς ουροφόρου σωληναρίου υπάρχει μία απότομη μετάπτωση προς το κατιόν σκέλος της αγκύλης του Henle. Οι νεφρώνες βραχείας αγκύλης έχουν βραχύ κατιόν λεπτό σκέλος που μεταπίπτει στο παχύ ανιόν κοντά στην καμπή της αγκύλης. Οι νεφρώνες μακράς αγκύλης έχουν μακρύ κατιόν λεπτό σκέλος που εισέρχεται στον έσω μυελό, σχηματίζει μία καμπή και επιστρέφει σαν μακρύ ανιόν λεπτό σκέλος. Τα λεπτά σκέλη της αγκύλης του Henle παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη συμπύκνωση και την αραίωση των ούρων. Το λεπτό ανιόν σκέλος παρουσιάζει χαμηλή ωσμωτική

διαπερατότητα για το νερό, μέτρια διαπερατότητα για την ουρία και υψηλή για το NaCl. Συνολικά, τα λεπτά σκέλη της αγκύλης του Henle επανααρροφούν το 15% περίπου του σπειραματικού διηθήματος υπερδιηθήματος και πάνω από το 25% του νατρίου και του χλωρίου(1).

**Άπω ουροφόρο σωληνάριο:** Το άπω ουροφόρο σωληνάριο περιλαμβάνει δύο μορφολογικά διαφορετικά τμήματα, το παχύ ανιόν σκέλος (ΠΑΣ) της αγκύλης του Henle και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο (ΑΕΣ). Το ΠΑΣ διασχίζει την εξωτερική ζώνη του μυελού και πορεύεται προς τα επάνω εντός του φλοιού και πλησίον του σπειράματος προέλευσης του για να καταλήξει αμέσως μετά στην πυκνή κηλίδα. Έτσι το ΠΑΣ διαιρείται σε μυελώδες και φλοιώδες τμήμα. Όσον αφορά την λειτουργία του, επανααρροφά ενεργητικά NaCl, φαινόμενο που διαμορφώνεται από έναν μηχανισμό συν-μεταφοράς  $\text{Na}^+$  - $\text{K}^+$  - $2\text{Cl}^-$  στην κορυφαία κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η κυτταρική λειτουργία του μυελώδους του ΠΑΣ είναι να διατηρεί υπέρτονο το διάμεσο μυελώδη ιστό που επιτρέπει τη μέγιστη συμπύκνωση των ούρων, ενώ το φλοιώδες τμήμα εξακολουθεί την αραίωση του σωληναριακού υγρού επιτρέποντας το σχηματισμό ούρων μέγιστης αραίωσης. Στο σημείο αυτό, ο ολικός όγκος του αρχικού σπειραματικού υπερδιηθήματος στο νεφρώνα έχει μειωθεί κατά 85%. Το ΠΑΣ επανααρροφά, επίσης, ασβέστιο από το σωληναριακό υγρό. Επίσης, στο συγκεκριμένο τμήμα επιτελείται η μεταφορά διπτανθρακικών καθώς και η ενεργητική και παθητική μεταφορά του  $\text{NH}_4^+$  έξω από τον αυλό και μέσα στο διάμεσο ιστό. Η μεταφορά στη συνέχεια με τη μορφή  $\text{NH}_3$  μέσα στον αυλό του αθροιστικού σωληναρίου γίνεται, επίσης, στο ΠΑΣ. Έτσι, η περιοχή αυτή του νεφρώνα παίζει σημαντικό ρόλο στην οξινοποίηση του σωληναριακού υγρού. Το φλοιώδες τμήμα του ΠΑΣ είναι μία κύρια θέση επαναρρόφησης του μαγνησίου. Στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο (ΑΕΣ) το χλωριούχο νάτριο εξακολουθεί να υφίσταται επαναρρόφηση. Το τμήμα αυτό αποτελεί μία επιπλέον θέση επαναρρόφησης ασβεστίου, η οποία διεγείρεται από την καλσιτονίνη και την παραθορμόνη(1).

**Συνδετικά σωληνάρια:** Τα συνδετικά σωληνάρια, ή συνδετικά τμήματα, συνδέουν τα ΑΕΣ με το σύστημα των αθροιστικών σωληναρίων. Αντιπροσωπεύοντας ένα μεταβατικό τμήμα στον ανθρώπινο νεφρό, το συνδετικό σωληνάριο απαρτίζεται από 4 ειδικούς τύπους κυττάρων, που προέρχονται από την ανάμιξη κυττάρων από το παρακείμενο ΑΕΣ και την αρχική μοίρα του αθροιστικού σωληναρίου (ΑΣ). Η λειτουργία αυτού του τμήματος έγκειται στη μεταφορά ασβεστίου, που μεσολαβείται από την παραθορμόνη, την επαναρρόφηση του νατρίου και την απέκκριση του καλίου. Το συνδετικό τμήμα σχετίζεται επίσης με τη μεταφορά πρωτονίων και

διπτανθρακικών και αποτελεί μία πρωτεύουσα θέση παραγωγής και έκκρισης καλλικρεΐνης στο νεφρό(1, 2).

**Αθροιστικό σωληνάριο:** Το αθροιστικό σωληνάριο ξεκινάει από το φλοιό και κατέρχεται διαμέσου του μυελού προς την κορυφή της θηλής. Μπορεί να διακριθεί σε τρεις μοίρες, τη φλοιώδη, την έξω μυελώδη και την έσω μυελώδη. Υπάρχει εξαιρετική κυτταρική ετερογένεια κατά μήκος του αθροιστικού σωληναρίου. Το φλοιώδες αθροιστικό σωληνάριο (ΦΑΣ) μπορεί να υποδιαιρεθεί στο αρχικό αθροιστικό σωληνάριο (ΑΑΣ) και στο τμήμα της μυελώδους ακτίνας. Το ΦΑΣ αποτελείται από τα κύρια κύτταρα και τα παρεμβαλλόμενα. Το αθροιστικό σωληνάριο αντιπροσωπεύει το τελικό τμήμα στο νεφρικό σωληνάριο, που τροποποιεί τον όγκο και την σύνθεση σε διαλυτές ουσίες του σωληναριακού υγρού. Καταρχήν, η μεταφορά νερού γίνεται μέσω μοριακών διαύλων, των υδροπορινών 2,3 και 4. Σε όλα τα τμήματά του, η ωσμωτική διαπερατότητα ελέγχεται κατά κύριο λόγο από τη βαζοπρεσσίνη. Επιπλέον, το σύνολο του αθροιστικού σωληναρίου εμπλέκεται στη μεταφορά πρωτονίων, και επομένως στη λεπτή ρύθμιση της έκκρισης οξέος από το νεφρό. Τα παρεμβαλλόμενα κύτταρα στο έξω μυελώδες αθροιστικό σωληνάριο είναι υπεύθυνα για την έκκριση ιόντων υδρογόνου, ενεργητική διεργασία διεγερόμενη από τα αλατοκορτικοειδή. Σχετικά με η μεταφορά ουρίας, το φλοιώδες και το μυελώδες τμήμα του αθροιστικού σωληναρίου είναι ευρέως αδιαπέραστο από την ουρία. Στο τελικό τμήμα του έσω μυελώδους αθροιστικού σωληναρίου παρατηρείται επαναρόφηση της ουρίας μέσω μιας οδού διευκόλυνσης της μεταφοράς της, η οποία είναι ευαίσθητη στην βαζοπρεσσίνη και βοηθά στη διατήρηση μιας υψηλής συγκέντρωσης ουρίας στον εν τω βάθει έσω μυελό για να διευκολύνει την ανακύκλωση της ουρίας που είναι σημαντική για τη μέγιστη συμπίκνωση των ούρων. Τέλος, αναφορικά με τη μεταφορά νατρίου και καλίου στο αθροιστικό σωληνάριο, αυτή ελέγχεται κατά κύριο λόγο από την αλδοστερόνη(1, 2).

## ΜΕΡΟΣ Ι: ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ (ΧΝΝ)

#### 2.1 Ορισμός Χρόνιας Νεφρικής Νόσου

Χρόνια νεφρική νόσο (ΧΝΝ) ονομάζουμε τη μη αναστρέψιμη μείωση της νεφρικής λειτουργίας. Αποτελεί μία εξελικτική νόσο που χαρακτηρίζεται από αυξανόμενη αδυναμία των νεφρών να διατηρήσουν φυσιολογικά χαμηλά επίπεδα των προϊόντων μεταβολισμού των πρωτεϊνών (ουρία), φυσιολογική αρτηριακή πίεση, αιματοκρίτη, ισοζύγιο νατρίου και καλίου, και οξεοβασική ισορροπία. Παλαιότερα χρησιμοποιούνταν ο όρος Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (Chronic Renal Failure), ο οποίος όμως αντικαταστάθηκε από τον όρο Χρόνια Νεφρική Νόσο (Chronic Renal Disease) για όλα τα στάδια εκτός από την Νεφροπάθεια Τελικού Σταδίου. Δείκτης μέτρησης της νεφρικής λειτουργίας είναι το **GFR (glomerular filtration rate)** και ως χρόνια νεφρική νόσο ορίζουμε το  $GFR < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  για 3 ή περισσότερους μήνες(1, 3).

#### 2.2 Ταξινόμηση Χρόνιας Νεφρικής Νόσου

Η ΧΝΝ ταξινομείται βάση του GFR σε 5 στάδια:

- **Στάδιο 1:** Νεφρική βλάβη με φυσιολογικό ή ελαφρώς αυξημένο GFR ( $>90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ )
- **Στάδιο 2:** Ήπια μείωση του GFR ( $60-89 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ )
- **Stage 3:** Μέτρια μείωση του GFR ( $30-59 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ )
- **Stage 4:** Σοβαρή μείωση του GFR ( $15-29 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ )
- **Stage 5:** Νεφρική ανεπάρκεια ( $GFR < 15 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  ή αιμοδιύλιση) (3)

#### 2.3 Επιδημιολογικά δεδομένα Χρόνιας Νεφρικής Νόσου:

Υπολογίζεται ότι η ΧΝΝ αφορά περίπου στο 8% του πληθυσμού παγκοσμίως (3) ενώ σε κάποιες χώρες η επίπτωση ξεπερνά το 10%. Σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, 20 εκατομμύρια Αμερικανοί πάσχουν από ΧΝΝ, με το 40%

να αφορά σε άτομα > 65 ετών. Η ΧΝΝ φαίνεται να αποτελεί την 9<sup>η</sup> αιτία θανάτου στις ΗΠΑ. Το κόστος για την θεραπεία της είναι υψηλό. Η μέση ηλικία των ασθενών που μπαίνουν σε θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης (Μονάδα Τεχνητού Νεφρού) είναι τα 60 έτη και τα κυριότερα αίτια θανάτου είναι τα καρδιαγγειακά συμβάματα(3-5).

## **2.4 Αίτια Χρόνιας Νεφρικής Νόσου**

Τα αίτια της Νεφροπάθειας Τελικού Σταδίου είναι πολλά και γνωστά, όμως δεν είναι γνωστή η συχνότητα των διαφορετικών τύπων της χρόνιας νεφρικής νόσου, λόγω του ποικίλου ρυθμού εξέλιξής της. Η ιδιοπαθής αρτηριακή υπέρταση αποτελεί ένα συχνό αίτιο νεφρικής νόσου, όμως η τάση ανάπτυξης νεφρικής νόσου σε απάντηση στη νεφρική βλάβη επηρεάζεται και από γενετικούς παράγοντες. Επίσης, Χρόνια Νεφρική Νόσος αναπτύσσεται στο 30% περίπου των διαβητικών τύπου I και II, με τη μέγιστη επίπτωση 15 περίπου έτη μετά την εμφάνιση του σακχαρώδη διαβήτη. Από τις χρόνιες σπειραματονεφρίτιδες, η εστιακή σπειραματοσκλήρυνση και η μεμβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα ταχείας εξέλιξης στους ενήλικες. Σημαντική μείωση έχει σημειωθεί στο ποσοστό των ασθενών με νεφρίτιδα στα πλαίσια συστηματικού ερυθματώδους λύκου που εξελίσσονται σε νόσο τελικού σταδίου, λόγω προόδου στην θεραπεία της νόσου, όπως επίσης και το σκληρόδερμα, η κοκκιωμάτωση Wegener και άλλες αγγειίτιδες (Πίνακας 1)(1, 3). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δύο πρώτα αίτια που αναφέρονται στον πίνακα 1 (διαβητική σπειραματοσκλήρυνση και υπερτασική νεφροσκλήρυνση) αποτελούν εξωνεφρικά/δευτεροπαθή αίτια ΧΝΝ και είναι πολύ συχνότερα από τα υπόλοιπα που είναι πρωτοπαθή.



**Πίνακας 1: ΑΙΤΙΑ ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ**

<b>Διαβητική σπειραματοσκλήρυνση</b>	
<b>Υπερτασική νεφροσκλήρυνση</b>	
<b>Σπειραματική Νόσος</b>	Σπειραματονεφρίτιδα Αμυλοείδωση, νόσος ελαφρών αλύσεων ΣΕΛ, κοκκιωμάτωση Wegener
<b>Διαμεσοσωληναριακή νόσος</b>	Παλίνδρομη νεφροπάθεια (χρόνια πυελονεφρίτιδα) Νεφροπάθεια από αναλγητικά Αποφρακτική νεφροπάθεια (λίθοι, καλοήθης υπερτροφία προστάτη)
<b>Αγγειακά νοσήματα</b>	Μυέλωμα του νεφρού Σκληρόδερμα Αγγείιτιδα Νεφραγγειακή νεφρική ανεπάρκεια Αθηροεμβολική νεφροπάθεια
<b>Κυστικά νοσήματα</b>	Πολυκυστική νόσος του νεφρού Κυστική νόσος του μυελού των νεφρών

Από βιβλιογραφική αναφορά (1)

## **2.5 Παθοφυσιολογία της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου**

Η παθοφυσιολογία της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου είναι πολύπλοκη και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το πρωτοπαθές αίτιο. Μετά την οξεία ή χρόνια δράση του εκλυτικού παράγοντα, όπως είναι η διαβητική νεφροπάθεια ή η νεφρίτιδα του λύκου, ενεργοποιούνται κοινά μονοπάτια που διαιωνίζουν την σπειραματική ή νεφροσωληναριακή βλάβη. Αυτοί οι επιβλαβείς μηχανισμοί, ως αποτέλεσμα ενός πρωτοπαθούς αιτίου, διακρίνονται σε αιμοδυναμικούς και μη-αιμοδυναμικούς μηχανισμούς. Κατά την εξέλιξη της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου, ανεξαρτήτως του πρωτοπαθούς αιτίου, παρατηρείται απώλεια των νεφρώνων. Οι υπόλοιποι νεφρώνες που διατηρούνται βιώσιμοι ή έχουν υποστεί μικρότερες βλάβες, προσαρμόζονται ή μεγεθύνονται, ενώ η κάθαρση ανά νεφρώνα αυξάνεται σημαντικά. Εάν η εκλυτική διεργασία είναι διάχυτη, αιφνίδια και σοβαρή, όπως σε ορισμένες περιπτώσεις

ασθενών με ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα (μηνοειδής σπειραματονεφρίτιδα), πιθανόν να επακολουθήσει οξεία ή υποξεία νεφρική ανεπάρκεια με ταχεία ανάπτυξη νεφροπάθειας τελικού σταδίου. Στην πλειοψηφία ωστόσο των ασθενών, η επιδείνωση της νόσου είναι βαθμιαία.

## 2.6. Κλινικά και Εργαστηριακά χαρακτηριστικά της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου

Οι ασθενείς συνήθως δεν προσέρχονται πριν μπουν σε προχωρημένα στάδια της νόσου, όταν μεγάλο μέρος της νεφρικής λειτουργίας έχει ήδη χαθεί. Ασθενείς με προοδευτικά επιδεινούμενη πρωτοπαθή σπειραματοπάθεια μπορεί να εμφανίσουν νεφρωσικό σύνδρομο (π.χ. μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια), υποτροπιάζον νεφριτιδικό σύνδρομο (π.χ. μεμβρανοϋπερπλαστική ή μεσαγγειοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα), ή υποτροπιάζουσα μακροσκοπική αιματουρία (π.χ. IgA νεφροπάθεια). Οι ασθενείς με συστηματικό νόσημα που δύναται να προσβάλλει τους νεφρούς πρέπει να ελέγχονται τακτικά για πρωτεϊνουρία ή αιματουρία. Παραδείγματα τέτοιων νοσημάτων αποτελούν ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, η κοκκιωμάτωση Wegener και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος. Τα βασικά κλινικοεργαστηριακά ευρήματα της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 2(1).

**Πίνακας 2: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ**

<i>Πρώιμα</i>	<i>Όψιμα</i>
Υπέρταση	Καρδιακή ανεπάρκεια
Λευκωματουρία, αυξημένο άζωτο ουρίας αίματος ή κρεατινίνης ορού	Αναιμία
Νεφρωσικό σύνδρομο	Ορογονίτιδα
Υποτροπιάζον νεφριτιδικό σύνδρομο	Σύγχυση, κώμα
Μακροσκοπική αιματουρία	Ανορεξία
	Έμετος
	Περιφερική νευροπάθεια
	Υπερκαλιαιμία
	Μεταβολική οξέωση

Από βιβλιογραφική αναφορά (1)

## 2.7. Ασυμπτωματική πρωτεϊνουρία

Κάθε πρωτεϊνουρία δεν είναι εξ ορισμού σπειραματικής προέλευσης. Σωληναριακή βλάβη μπορεί να συνδυασθεί με μέχρι 1-2 gr πρωτεΐνης στην συλλογή ούρων

24ώρου. Βαρύτερη πρωτεΐνουρία >3 gr/24ωρο είναι σχεδόν δηλωτική σοβαρής σπειραματικής βλάβης(3).

## **2.8 Νεφρωσικό Σύνδρομο**

Το νεφρωσικό σύνδρομο ορίζεται ως πρωτεΐνουρία που υπερβαίνει τα 3 gr ημερησίως, σε συνδυασμό με υπολευκωματαιμία, οίδημα και υπερλιπιδαιμία. Στην κλινική πράξη, πολλοί νεφρολόγοι αναφέρονται στην πρωτεΐνουρία «νεφρωσικού τύπου», ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία των υπολοίπων κλινικώς εκδηλώσεων του συνδρόμου, καθώς αυτές αποτελούν ουσιαστικά επιπλοκές της πρωτεΐνουρίας. Η υπολευκωματαιμία είναι απότοκος της απώλειας πρωτεΐνης στα ούρα, αλλά οφείλεται και στον καταβολισμό της λευκωματίνης που διηθείται από το εγγύς σωληνάριο, καθώς και στην ανακατανομή της λευκωματίνης στον οργανισμό. Η κατακράτηση υγρών και άλατος στο νεφρωσικό σύνδρομο οφείλεται από τη μία πλευρά στη χαμηλή κολλοειδωσμητική πίεση του πλάσματος, απότοκο της πρωτεΐνουρίας, που οδηγεί σε ενεργοποίηση του άξονα ρελινης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, από την άλλη πλευρά τοπικοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την κατακράτηση υγρών στο νεφρωσικό ασθενή ακόμα και πριν εγκατασταθεί η υπολευκωματαιμία.

Το νεφρωσικό σύνδρομο διακρίνεται σε ιδιοπαθές ή πρωτοπαθές και σε δευτεροπαθές. Τα αίτια είναι πολυάριθμα, όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα 3(1, 3).

**Πίνακας 3: ΑΙΤΙΕΣ ΝΕΦΡΩΣΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ**

<b>Ιδιοπαθές ή πρωτοπαθές νεφρωσικό σύνδρομο</b>	Νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων Εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση Μεμβρανώδης νεφροπάθεια Μεμβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα Άλλες υπερπλαστικές και σκληρυντικές σπειραματονεφρίτιδες
<b>Δευτεροπαθές νεφρωσικό σύνδρομο</b>	Συστηματικά νοσήματα (σακχαρώδης διαβήτης, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, αγγειίτιδες) Λοιμώξεις (βακτηριακές, ιογενείς, παρασιτικές) Φάρμακα (χρυσός, πενικιλλαμίνη, βαρέα μέταλλα, ΜΣΑΦ, λίθιο, ριφαμπικίνη) Κακοήθη νοσήματα (συμπαγείς όγκοι, αιματολογικές κακοήθειες) Αλλεργίες, δηλητήρια, ανοσοποίηση Άλλα (ορονοσία, απόρριψη μοσχεύματος, κακοήθης παχυσαρκία)

Από βιβλιογραφική αναφορά (1)

## **2.9 Νεφριτιδικό Σύνδρομο**

Το νεφριτιδικό σύνδρομο αποτελεί ένα σύνολο κλινικών εκδηλώσεων που χαρακτηρίζεται από ολιγοανουρία με σκουρόχρωμα ούρα λόγω αιματουρίας, ταχεία άνοδο της κρεατινίνης με ανάπτυξη αζωθαιμίας, περιφερικό οίδημα και σοβαρή υπέρταση. Στις νόσους που εμφανίζονται με νεφριτιδικό σύνδρομο συγκαταλέγονται οι μεταλοιμώδεις σπειραματονεφρίτιδες, οι κολλαγονώσεις με κυριότερη τον

Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο, ορισμένες αγγειίτιδες που προσβάλουν τους νεφρούς και περιστατικά μεμβρανοϋπερπλαστικής σπειραματονεφρίτιδας.

Η παθολογοανατομική εικόνα των νόσων με ανοσοσυμπλέγματα και νεφριτιδικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση μεγάλων σε μέγεθος ανοσοσυμπλεγμάτων κάτω από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του τριχοειδούς του σπειράματος. Επομένως αυτά τα ανοσοσυμπλέγματα μπορούν να ενεργοποιούν τον καταρράκτη του συμπληρώματος και να προσελκύουν από την κυκλοφορία λευκοκύτταρα που προκαλούν εξιδρωματική φλεγμονώδη αντίδραση. Ακολουθεί η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών, ενδοθηλιακών και επιθηλιακών κυττάρων και η πλήρης κατάλυση της αρχιτεκτονικής του σπειράματος με στένωση ή πλήρη απόφραξη του αυλού του τριχοειδούς. Αυτό προκαλεί μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και ουραιμία, αλλά παράλληλα, επειδή η σωληναριακή λειτουργία διατηρείται σε σχετικά φυσιολογικά επίπεδα, τα ούρα είναι λίγα και συμπυκνωμένα (υψηλό ειδικό βάρος και χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο)(3).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΝΕΦΡΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

**3.1. Ορισμός νεφρικής ίνωσης.**

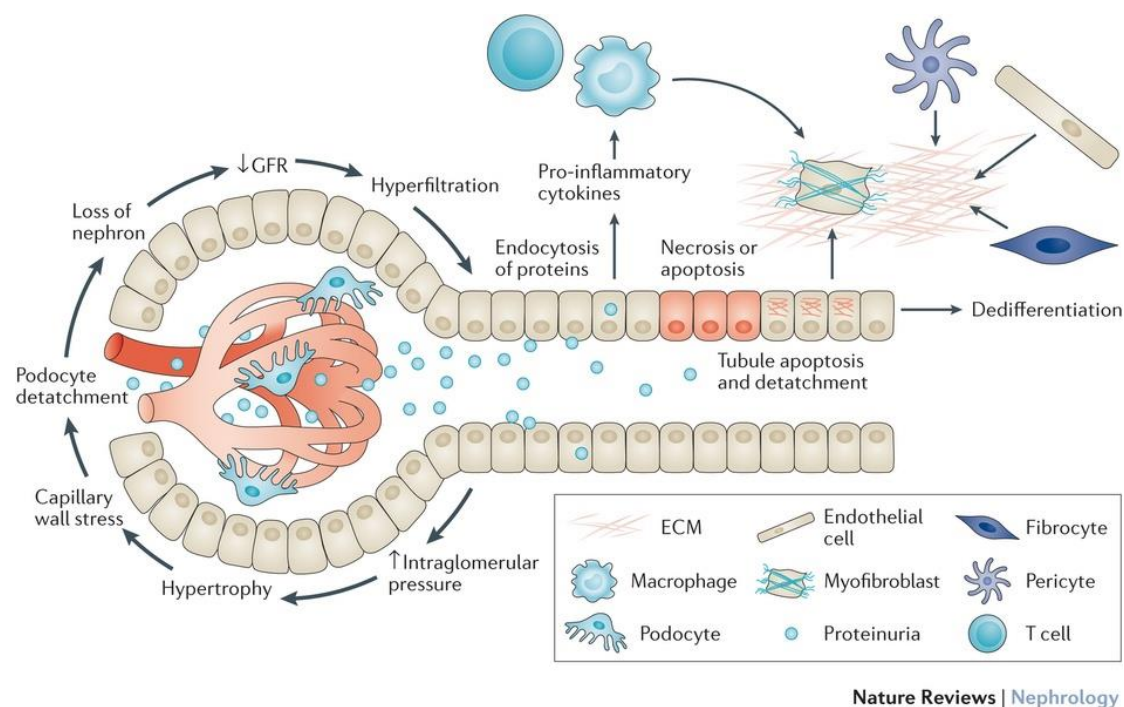
Η ίνωση αποτελεί μια μακροχρόνια διεργασία καταστροφής των ιστών που αποτελεί χαρακτηριστικό πολλών ασθενειών και μπορεί να προσβάλλει σχεδόν όλα τα οργανικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των ινωτικών διαταραχών του πνεύμονα, της ηπατικής κίρρωσης, της συστηματικής σκλήρυνσης του δέρματος, των καρδιαγγειακών παθήσεων, των καρκινικών όγκων, της χρόνιας απόρριψης μοσχεύματος και της προοδευτικής νεφρικής νόσου.

Η ίνωση ορίζεται συχνά ως μια διαδικασία επούλωσης τραύματος που έχει διαφύγει από τον έλεγχο του οργανισμού. Οι βλάβες στους ιστούς μπορούν να προκύψουν από διάφορα ερεθίσματα, όπως λοιμώδεις παράγοντες, αυτοάνοσες αντιδράσεις, μηχανικούς τραυματισμούς, τα οποία επάγουν την φυσιολογική απόκριση του οργανισμού για την αποκατάσταση της βλάβης και την αναγέννηση του τραυματισμένου ιστού. Η ίνωση προκύπτει συνήθως μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους τραυματισμού, φλεγμονής και διεργασιών επιδιόρθωσης των ιστών, ως αποτέλεσμα χρόνιων φλεγμονωδών αντιδράσεων που επάγονται από κάποιο συνεχές ερέθισμα. Κύριο χαρακτηριστικό της ίνωσης αποτελεί η συσσώρευση κυττάρων ινοβλαστών στην περιοχή που έχει υποστεί βλάβη και η ανεξέλεγκτη παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, οδηγώντας σε απώλεια της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας του ιστού και σε πολλές περιπτώσεις οργανική ανεπάρκεια και θάνατο (6, 7).

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η ίνωση αποτελεί κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας, ενώ υπολογίζεται πως το 45% των θανάτων στον ανεπτυγμένο κόσμο μπορεί να αποδοθεί σε κάποια μορφή ινωτικής ασθένειας. Ωστόσο, παρά το μεγάλο αντίκτυπό της στην ανθρώπινη υγεία, δεν έχει βρεθεί ακόμα αποτελεσματική θεραπεία στόχευσης των ινωτικών μηχανισμών.

Η προοδευτική ίνωση στον νεφρό είναι ουσιαστικά το τελικό μονοπάτι στην παθογένεια όλων των νοσημάτων που οδηγούν σε Χρόνια Νεφρική Νόσο τελικού σταδίου. Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα στην διάμεση νεφρική ίνωση είναι η εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας σε συνδυασμό με την συμμετοχή των

φλεγμονωδών κυττάρων, την απώλεια σωληναριακών κυττάρων, την συσσώρευση ινοβλαστών και τη μείωση των περισωληναριακών μικροαγγείων(8).



**Εικόνα 3: Μηχανισμοί ίνωσης.** Από βιβλιογραφική αναφορά (8).

Οι άνθρωποι χάνουν περίπου 4.500 νεφρώνες τον χρόνο ανά νεφρό, ενώ παράλληλα έχει προταθεί ότι το GFR μειώνεται κατά 10ml/min ανά δεκαετία. Η γήρανση του οργανισμού φαίνεται να οδηγεί στην διαταραχή της λειτουργίας των νεφρών με πολλαπλούς μηχανισμούς, όπως η μείωση των τελομερών, η μεθυλίωση του DNA, η μείωση των προγονικών κυττάρων (stem cells) και η διαταραχή στον πολλαπλασιασμό των σωληναριακών κυττάρων. Αυτοί όλοι οι γενετικοί μηχανισμοί, επακόλουθοι της γήρανσης, σε συνδυασμό με το οξειδωτικό stress και την δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, οδηγούν στις δομικές διαταραχές στους νεφρώνες και στην προοδευτική σπειραματική και νεφροσωληναριακή ίνωση(5).

### 3.2 Διαμεσολαβούμενοι μοριακοί μηχανισμοί και σηματοδοτικά μονοπάτια στην νεφρική ίνωση

#### 3.2.1 Ο ρόλος των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών

Οι ινοβλάστες αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό των νεφρικών διάμεσων κυττάρων και είναι τα κύρια κύτταρα που συνιστούν την εξωκυττάρια ουσία, η οποία θεωρείται

ο «σκελετός» του νεφρικού παρεγχύματος. Οι ινοβλάστες αλληλεπιδρούν με τα υπόλοιπα κύτταρα, όπως τα δενδριτικά κύτταρα, κατά την διάρκεια διαφόρων κυτταρικών διεργασιών. Αυτά τα κύτταρα διαθέτουν ένα μυοϊνοβλαστικό φαινότυπο που ενεργοποιείται κάτω από την επίδραση παρακρινών σημάτων μετά την πρόκληση βλάβης στην σωληναριακή βασική μεμβράνη (Tubular Basement Membrane- TBM), με αποτέλεσμα την παραγωγή κολλαγόνου τύπου III. Αυτό το φαινόμενο αποτελεί βασικό γεγονός στην διεργασία της νεφρικής ίνωσης (10). Η ενεργοποίηση του τοπικού πληθυσμού ινοβλαστών των ιστών και η διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών που εποικούν περιφερικά όργανα θεωρούνται σημαντικές πηγές ινοβλαστών στους ινωτικούς ιστούς (8-10). Επιπλέον, κάποιες μελέτες έχουν υποδείξει τη συνεισφορά του μηχανισμού αποδιαφοροποίησης επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) ως πηγή ινοβλαστών κατά την ανάπτυξη της ίνωσης (9, 10)

Ο μηχανισμός EMT έχει περιγραφεί και μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και μορφογένεση, την οργανογένεση της καρδιάς, του μυοσκελετικού συστήματος, των κρανιακών δομών και του περιφερικού νευρικού συστήματος, ενώ θεωρείται πως αποτελεί τον υποκείμενο μηχανισμό της διεισδυτικότητας και μεταστατικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων (6). Ωστόσο, λιγότερο κατανοητή και αποδεκτή είναι η διαδικασία του EMT που έχει περιγραφεί στα πλαίσια επιθηλιακής βλάβης σε όργανα όπως τα νεφρά, το ήπαρ και ο πνεύμονας. Ενώ από *in vitro* μελέτες αποδεικνύεται η μετατροπή επιθηλιακών κυττάρων σε κύτταρα με μεσεγχυματικό φαινότυπο, τα στοιχεία από *in vivo* μελέτες που υποστηρίζουν ότι υφίσταται ο μηχανισμός EMT σε ινωτικούς ιστούς είναι περιορισμένα και σχετίζονται κυρίως με το πειραματικό μοντέλο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα σε τρωκτικά (Unilateral Ureteral Obstruction) που χαρακτηρίζεται από την ταχεία εξέλιξη νεφρικής ίνωσης. Επιπλέον, σε βιοψίες από ανθρώπινο παθολογικό νεφρικό ιστό έχουν βρεθεί επιθηλιακά κύτταρα που συνεκφράζουν επιθηλιακούς και μεσεγχυματικούς δείκτες, υποδεικνύοντας ένα μεταβατικό φαινότυπο (11). Άλλες πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη πολλών πηγών ενεργοποιημένων ινοβλαστών (12). Είναι πολύ πιθανό η ενεργοποίηση των ινοβλαστών στους ινωτικούς ιστούς να πυροδοτείται από ξεχωριστούς μηχανισμούς σε διαφορετικά όργανα ή διαφορετικά πειραματικά μοντέλα ίνωσης.

Οι μυοϊνοβλάστες είναι τα κύτταρα που συμμετέχουν καθοριστικά στην παθογένεια της νεφρικής ίνωσης αφού, είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή και εναπόθεση των



συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (10, 12), απαντώνται σπάνια στον υγιή ιστό και η ύπαρξή τους αποτελεί προγνωστικό δείκτη ίνωσης του διάμεσου χώρου και ατροφίας των σωληναρίων (12). Διαφέρουν από τους ινοβλάστες στο ότι περιέχουν μικροϊνίδια με πυκνές περιοχές (stress fibers), αραιά μυοϊνίδια στην περιφέρεια του κυττάρου και παρουσιάζουν διαμεμβρανικές συνδέσεις μεταξύ εξωκυττάριας ινωδονεκτίνης (fibronectin) και των ενδοκυττάρων μικροϊνιδίων ακτίνης. Ο μυοϊνοβλάστης χαρακτηρίζεται από την έκφραση της  $\alpha$ -SMA, η οποία παρέχει στο κύτταρο ικανότητα σύσπασης. Η έκφραση  $\alpha$ -SMA είναι χαρακτηριστική της ιστικής αναδόμησης. Μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί ένας δείκτης ειδικός για τους μυοϊνοβλάστες είναι, όμως, θετικοί στη vimentin, στο ectodomain A της fibronectin και στην πρωτεΐνη S100A4 (Fibroblast Specific Protein-1, FSP-1), η οποία εκφράζεται και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Μετά από μηχανικό (π.χ. υδροδυναμικές δυνάμεις, σωληναριακή τάση) ή χυμικό ερέθισμα (π.χ. TGF- $\beta$ ), ο κυτταροσκελετός ακτίνης των ινοβλαστών ανακατανέμεται, τα μικροϊνίδια μετακινούνται στην περιφέρεια του κυττάρου, σχηματίζονται εστίες προσκόλλησης (focal adhesions) και η  $\alpha$ -SMA ενσωματώνεται στα μικροϊνίδια. Επομένως, οι ινοβλάστες ενεργοποιούνται και μετατρέπονται σε ενεργούς μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι παράγουν και εναποθέτουν εξωκυττάρια ουσία. Οι σπειραματικοί μυοϊνοβλάστες προέρχονται από τα μεσαγγειακά κύτταρα, η προέλευση, όμως, των μυοϊνοβλαστών του διάμεσου ιστού δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί πλήρως. Πιθανές πηγές προέλευσής τους είναι οι ινοβλάστες του διάμεσου ιστού, τα περιαγγειακά περικύτταρα, τα ινοκύτταρα, τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα(13).

### 3.2.2 Ο ρόλος της εξωκυττάριας ουσίας

Βασικό ρόλο στην δημιουργία τη νεφρικής ίνωσης κατέχει η εκσεσημασμένη εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας, με την παρουσία ινών κολλαγόνου. Η ίνωση συνοδεύεται τόσο από ποσοτικές όσο και από ποιοτικές αλλαγές στην εξωκυττάρια ουσία. Στον ινωτικό νεφρό, ο διάμεσος χώρος είναι γεμάτος ινιδιοειδές υλικό που περιέχει κυρίως κολλαγόνο τύπου I, τύπου III, ινωδονεκτίνη αλλά και κατάλοιπα θραυσμάτων κολλαγόνου τύπου IV, παραλλαγές της ινωδονεκτίνης και πολλά άλλα μακρομόρια. Αυτή η διαδικασία νεφρικής ινωδογένεσης εμφανίζεται, αρχικά, σε μικρές εστίες της φλεγμονώδους περιοχής όπου, πυρήνες κολλαγόνου χρησιμοποιούνται ως γέφυρες με το κολλαγόνο των μυοϊνοβλαστών και, στη συνέχεια, επεκτείνονται και η ίνωση γίνεται διάχυτη. Η αποδόμηση της ECM βασίζεται στη δράση πρωτεασών και, οι πιο μελετημένες από αυτές είναι η οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases, MMPs) και η οικογένεια του σηματοδοτικού μονοπατιού της πλασμίνης. Αυτές οι δύο

οικογένειες πρωτεασών διασπούν την ECM καθώς και άλλες πρωτεΐνες, ανεξάρτητες της θεμέλιας ουσίας, απελευθερώνοντας προϊνωτικούς αυξητικούς παράγοντες που, παράδοξα, ενεργοποιούν την ίνωση. Πέραν των πρωτεασών που αναφέρθηκαν, φαίνεται ότι στη διαδικασία της ίνωσης συμμετέχει και η λυσοσωματική οικογένεια των καθεψινών (cathepsins) (10, 13, 14).

### 3.3.3 Ο ρόλος των φλεγμονωδών κυττάρων

Η πρόκληση ιστικής βλάβης ακολουθείται πρωτίστως από φλεγμονώδη αντίδραση. Η βλάβη ενεργοποιεί διαδικασίες παραγωγής διαφόρων παραγόντων τοπικά, αυξάνεται η τοπική αγγειακή διαπερατότητα, ενεργοποιούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μεταναστεύουν στην εστία της βλάβης ώστε να την επιδιορθώσουν. Έτσι και στο νεφρό, όταν τα σωληναριακά κύτταρα εκτεθούν σε ένα βλαπτικό ερέθισμα (για παράδειγμα σε μεταβολικούς παράγοντες όπως η αυξημένη ποσότητα πρωτεΐνης ή γλυκόζης, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, λοιμώδεις παράγοντες, τοξικές ουσίες), σε απάντηση στο βλαπτικό ερέθισμα, παράγουν κυτταροκίνες και χυμοκίνες. Η κλίση πυκνότητας χυμοκινών που δημιουργείται γύρω από τα σωληνάρια και τα περισωληναριακά τριχοειδή προσελκύει φλεγμονώδη κύτταρα, τα οποία διηθούν τον σωληναριοδιάμεσο χώρο. Στα κύτταρα αυτά περιλαμβάνονται τα λεμφοκύτταρα, τα μονοπύρρηνα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα μαστοκύτταρα. Αυτά τα φλεγμονώδη κύτταρα ενεργοποιούν μηχανισμούς παραγωγής διαλυτών παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνονται προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, προϊνωτικές κυτταροκίνες και μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας, οι οποίες δημιουργούν ένα εχθρικό μικροπεριβάλλον για τα σωληναριακά επιθηλιακά και τα τριχοειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα και, επίσης, ενεργοποιούν τους ινοβλάστες προς παραγωγή και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, ενώ η φλεγμονή στο σύνολό της επάγει τη δημιουργία ίνωσης, υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν ότι υποκατηγορίες λεμφοκυττάρων και μακροφάγων εμφανίζουν λειτουργίες που συμβάλλουν στον περιορισμό την ίνωσης.

Τα λεμφοκύτταρα φαίνεται να κατέχουν πρωτεύοντα ρόλο στην παθογένεια της νεφρικής ίνωσης. Ιδίως τα CD4+ T λεμφοκύτταρα θεωρούνται καθοριστικής σημασίας καθώς αυτά και όχι τόσο τα CD8+ φάνηκε να αυξάνουν την ίνωση σε ποντίκια με έλλειψη του RAG (Recombination-activating gene) ενώ η μείωση του συγκεκριμένου υποπληθυσμού λεμφοκυττάρων φάνηκε να οδηγεί σε αντίστοιχη αναχαίτιση της ινωτικής διαδικασίας.

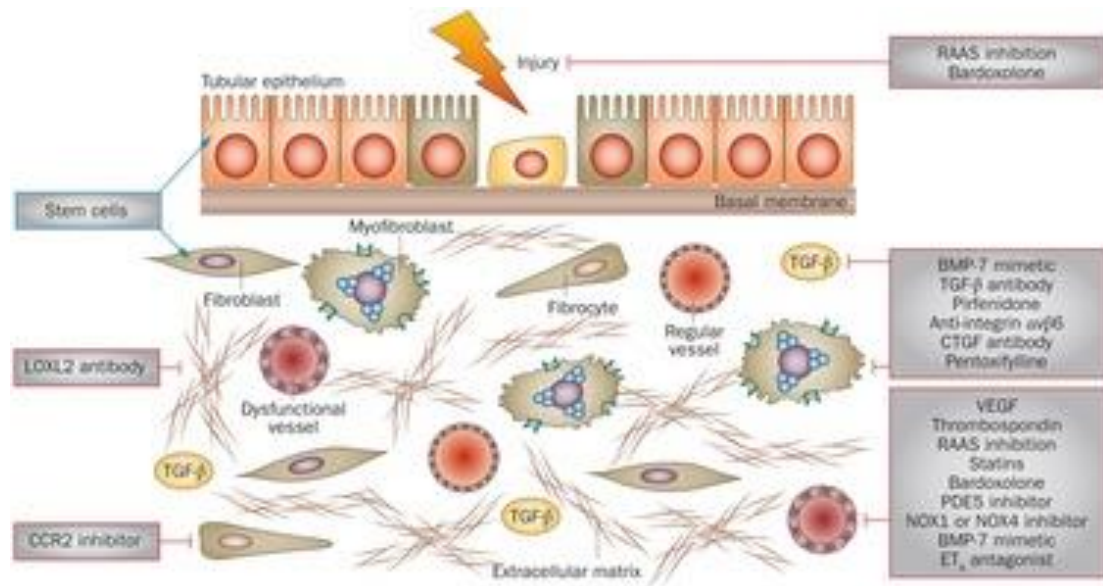
Τα μονοπύρηννα μακροφάγα, μία ετερογενής ομάδα λεμφοκυττάρων, παρουσιάζουν προϊνωτικές ιδιότητες, ιδίως τα CD11b+ κύτταρα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα παράγουν την γαλεκτίνη-3, έναν προϊνωτικό διαμεσολαβητή που περιλαμβάνει μία λεκτίνη συνδεδεμένη με β-γαλακτοσιδάση. Ο ρόλος των μακροφάγων στην παθογένεια της ίνωσης είναι πραγματικά πολύπλοκος, καθώς κάποιες υποομάδες μονοκυττάρων φαίνεται να περιορίζουν την ινωτική διαδικασία παρά να την πυροδοτούν.

Τα δενδριτικά κύτταρα είναι παρόντα σε σημαντικό αριθμό στον διάμεσο νεφρικό ιστό, ενώ πρόσφατα αποδείχθηκε η σημασία τους στην ινωγένεση(10, 13).

#### 3.3.4 Ο ρόλος των περικυττάρων στην νεφρική ίνωση

Τα περικύτταρα είναι συστατά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης που περιβάλλουν και υποστηρίζουν την μικροαγγειακή κυκλοφορία της περιοχής. Στον νεφρό τα περικύτταρα βρίσκονται σε επαφή με τα περισωληναριακά τριχοειδή. Τα συγκεκριμένα κύτταρα μαζί με τα ενδοθηλιακά ενσωματώνονται στην ίδια βασική μεμβράνη, την οποία προορίζονται να δημιουργούν, παράγοντας λαμινίνη και κολλαγόνο. Τα περικύτταρα συμβάλλουν στην σταθερότητα και στην ακεραιότητα την μικροαγγειακής κυκλοφορίας της περιοχής και είναι απαραίτητα για την δημιουργία της βασικής μεμβράνης και την παραγωγή των συστατικών της. Η αποτυχία ενσωμάτωσης των περικυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα κατά την διάρκεια της αγγειογένεσης οδηγεί σε κατάρρευση, ανευρυσματική διάταση ή αιμορραγία του αγγείου(15).

Η αποκόλληση των περικυττάρων από τα τριχοειδή, η διαφοροποίηση τους σε μυοϊνοβλάστες και η ρύθμιση της επιβίωσης ή της ενεργοποίησης αυτών των μυοϊνοβλαστών παρουσιάζονται ως ελκυστικά σενάρια θεραπευτικής στρατηγικής για την αντιμετώπιση της φλεγμονής, της ίνωσης και της παρεγχυματικής βλάβης στην ΧΝΝ. Σημαντικά μονοπάτια φαίνεται να παίζουν ρόλο σε αυτούς τους μηχανισμούς (εικόνα 4)(16).



**Εικόνα 4: Μονοπάτια και μόρια ως πιθανοί στόχοι για την αναστολή της ίνωσης.** Από βιβλιογραφική αναφορά (16).

#### 1) PDGFR μονοπάτια:

Οι υποδοχείς PDGFR $\alpha$  και  $\beta$  εκφράζονται στα περικύτταρα του νεφρού σε ηρεμία αλλά και σε short-term disease μοντέλα. Αυτοί οι υποδοχείς παράγονται από τα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα καθώς και από τα μακροφάγα, όπως φαίνεται σε μοντέλα νεφρικής νόσου. Το μπλοκάρισμα αυτών των υποδοχέων με την χρήση αντισωμάτων ή διαλυτών υποδοχέων που λειτουργούν ως συνδέτες μειώνουν την αποκόληση των περικυττάρων και την διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες, με αποτέλεσμα να μπορεί να αναστραφεί η ινωτική διεργασία. Αυτή η θεραπευτική στρατηγική μειώνει την στρατολόγηση κυττάρου του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και την ανάπτυξη μικροαγγειακής νόσου. Αξιοσημείωτη είναι και η χρήση συγκεκριμένων αναστολέων κινάσης σε κλινικές μελέτες που στοχεύουν στην αναστολή της ίνωσης σε ποικίλα όργανα μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης του PDGFR, χρήση που μπορεί να επιδράσει και σε άλλα μονοπάτια, στα οποία συμμετέχουν οι συγκεκριμένοι υποδοχείς(17, 18).

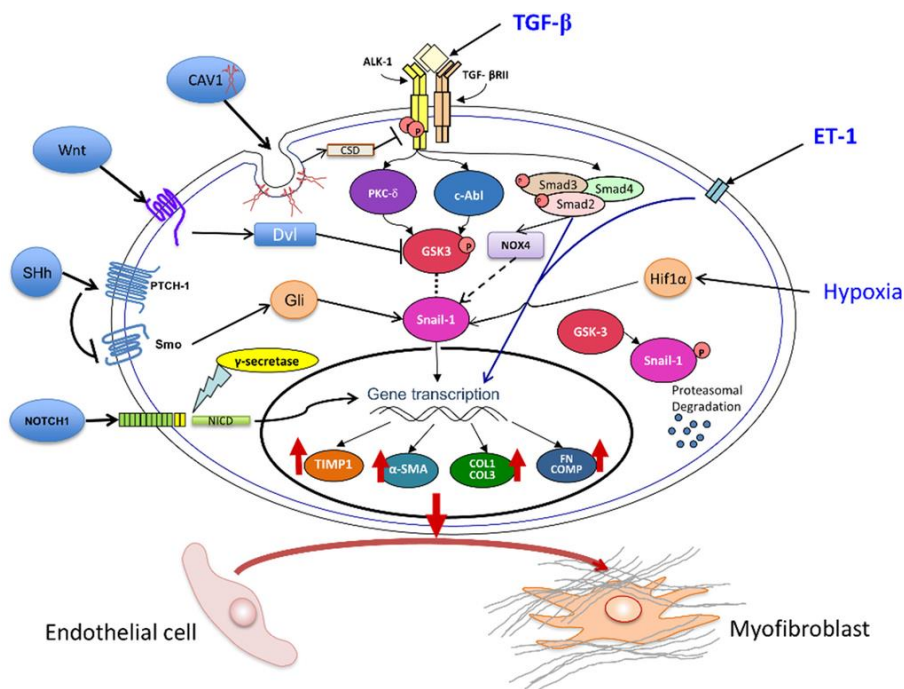
#### 2) VEGF μονοπάτι:

Ο υποδοχέας VEGF2 (VEGFR2) βρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του νεφρού. Εξάλειψη αυτού του υποδοχέα οδηγεί στον σχηματισμό ασταθών σπειραματικών τριχοειδών καθώς και στην δημιουργία μικροθρομβώσεων. Από την άλλη πλευρά, παρατεταμένη δράση του σήματος του VEGFR2 στην διάμεση νεφρίτιδα φαίνεται να

είναι ωφέλιμη. Η παρουσία έντονου σήματος VEGFR2 ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των περικυτάρων και την στρατολόγηση των λευκοκυττάρων. Παρότι το σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGFR2 αποτελεί έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο στην ΧΝΝ, απαιτείται περαιτέρω προσπάθεια για την διάκριση των σπειραματικών από τα περισωληναριακά τριχοειδή ώστε να στοχευθεί το σωστό μονοπάτι (19, 20).

### 3) TGF-β μονοπάτι:

Το παθολογικό σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β που συμμετέχει στην διαδικασία της ίωσης (συμπεριλαμβάνοντας και την νεφρική ίωση) είναι το πλέον καλά καθορισμένο και θεραπείες που στοχεύουν το μπλοκάρισμα του TGF-β βρίσκονται ήδη σε φάση κλινικών μελετών ινωτικών ασθενειών. Διαγονιδιακά ζώα με υπερέκφραση του παράγοντα TGF-β στον ηπατικό, επιδερμικό ή νεφρικό ιστό αναπτύσσουν ίωση παρουσιάζοντας αυξημένη κυτταρική απόπτωση στους αντίστοιχους ιστούς. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο υποδοχέας του TGF-β εκφράζεται στα περικύτταρα και το σήμα από τον συγκεκριμένο υποδοχέα είναι αρκετό ώστε να πυροδοτήσει την διαφοροποίηση των μυοϊνοβλαστών *in vivo* και *in vitro*. Άλλες μελέτες προτείνουν ότι το μη κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω των MAPKs, ως το κυρίαρχο στην πυροδότηση των μυοϊνοβλαστών και των προγονικών κυττάρων τους(21, 22).



**Εικόνα 5: Η δράση του TGF-β στην ίωση.** Από βιβλιογραφική αναφορά (22).

#### 4) CTGF μονοπάτι:

Ο αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού (CTGF, γνωστός και ως CCN2) είναι καλά αναγνωρισμένος ως αυξητικός παράγοντας ίνωσης στο νεφρό . Παράγεται από τα περικύτταρα και τα ποδοκύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση και στην διατήρηση της αγγείωσης. Παράλληλα, η διέγερση των περικυττάρων από τον CTGF μπορεί να διεγείρει τους μυοϊνοβλάστες ανεξάρτητα από το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ. Φαίνεται ότι ο CTGF μπορεί να πυροδοτήσει παθολογικό σήμα με στόχο την ενεργοποίηση και διέγερση των μυοϊνοβλαστών, σήμα που πιθανότατα εξαρτάται κι αυτό από τις MAPKs (23, 24).

#### 5) WNT/LRP6 μονοπάτια:

Το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT/β-Catenin είναι ένα εξελικτικά συντηρημένο μονοπάτι το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες, όπως η οργανογένεση, αλλά και στην παθογένεια πολλών νοσημάτων. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT/β-Catenin παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία ανάπτυξης της ίνωσης. Οι πρωτεΐνες WNT είναι γλυκοπρωτεΐνες που ασκούν τις δράσεις τους κυρίως μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT/β-Catenin. Σε κατάσταση ηρεμίας, δηλαδή χωρίς την ύπαρξη των WNT, η κυτταροπλασματική β-Catenin φωσφορυλιώνεται από το σύμπλεγμα axin-adenomatous polyposis coli protein (APC)-glucogen synthase kinase 3β (GSK-3β), στη συνέχεια ουμπικουϊνιώνεται και αποδομείται στο πρωτεάσωμα. Όταν οι πρωτεΐνες WNT προσδεθούν στο μεμβρανικό υποδοχέα frizzled FZD και στην πρωτεΐνη που συσχετίζεται με τον υποδοχέα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας LRP, τότε το σύμπλοκο διασπάται, η β-Catenin αποφωσφορυλιώνεται, δε διασπάται στο πρωτεάσωμα, συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και εισέρχεται στον πυρήνα. Στον πυρήνα, η β-Catenin, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα του παράγοντα των T-λεμφοκυττάρων (T-cell factor, TCF) και του λεμφοειδούς ενισχυτικού παράγοντα (Lymphoid enhancer factor, LEF), ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στόχων όπως της ινωδονεκτίνης, της MMP-7, του αναστατή του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (Plasmin activator inhibitor-1, PAI-1), του Twist και του Snail. Το αποτέλεσμα της σηματοδότησης WNT/β-Catenin εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του κυττάρου στο οποίο συμβαίνει και, ρυθμίζει την κυτταρική μοίρα κατά την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και τον κυτταρικό θάνατο (25-28)

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως τα περικύτταρα και οι μυοϊνοβλάστες που ενεργοποιούνται στις ασθένειες ουσιαστικά ενεργοποιούν το συγκεκριμένο μονοπάτι. Ο διαλυτός αναστολέας του WNT/  $\beta$ -Catenin που συνδέεται στον WNT-συνδέτη συνυποδοχέα LRP-6, είναι γνωστός και ως Dickkopf related protein 1 (DKK-1) και αναστέλλει την ενεργοποίηση των περικυττάρων in vitro. Όταν απελευθερώνεται, φαίνεται να μειώνει σημαντικά την φλεγμονή, την ίνωση στα τριχοειδή καθώς και την βλάβη του επιθηλίου. Σημαντικό στόχο του DKK-1 αποτελούν τα ενεργοποιημένα περικύτταρα και οι μυοϊνοβλάστες. Ο WNT υποδοχέας LRP-6 είναι σημαντικός για τα σηματοδοτικά μονοπάτια PDGFR, CTGF και TGF- $\beta$ R στα περικύτταρα και στους μυοϊνοβλάστες, οδηγώντας σε ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK στους μυοϊνοβλάστες. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μονοπάτι WNT καθώς και τα άλλα μονοπάτια που εμπλέκονται στην διαδικασία της ίνωσης συγκεντρώνονται στην πλασματική μεμβράνη, επιδρώντας καταλυτικά στην εξάπλωση του παθολογικού σήματος(23).

### 3.3.5 Ο ρόλος των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων

Τα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού είναι πολωμένα κύτταρα, δηλαδή η αυλική τους επιφάνεια έχει διαφορετικές ιδιότητες από ότι έχει η βασική τους επιφάνεια. Ενώνονται με τα παρακείμενα επιθηλιακά κύτταρα μέσω χασματικών συνδέσεων, δεσμοσωμάτων και συνδέσεων προσκόλλησης (που αποτελούνται μεταξύ άλλων και από τις πρωτεΐνες E-Cadherin, Zonula Occludens-1, ZO-1) και, σχηματίζουν ένα μονόστιβο επιθήλιο πάνω σε μια βασική μεμβράνη. Περιβάλλονται από διάμεση ουσία μέσα στην οποία υπάρχουν αραιοί ινοβλάστες (29).

Σημαντικό στη διαδικασία της νεφρικής ίνωσης θεωρείται από πολλούς ερευνητές το φαινόμενο της επιθηλιακής προς μεσεγγυματική μετατροπής των νεφρικών σωληναριακών κυττάρων (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT). Μέσω του φαινομένου αυτού, πιθανολογείται ότι τα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα συνεισφέρουν στη συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας. Παρόλο που τα επιθηλιακά κύτταρα δεν μετατρέπονται σε αυτούσιους ινωποκύτταρα κατά την διάρκεια της νεφρικής ίνωσης, φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ινωδογένεση. Τα επιθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη παρουσιάζουν φαινοτυπικές αλλαγές που περιλαμβάνουν και έναν μεταναστευτικό φαινότυπο. Αυτός ουσιαστικά ο μεταναστευτικός φαινότυπος χαρακτηρίζει το EMT, από την στιγμή μάλιστα που τα επιθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη ενεργοποιούν την γονιδιακή έκφραση πολλών παραγόντων, μεταξύ των οποίων και του μεταγραφικού παράγοντα SNAIL, ενώ ταυτόχρονα εκφράζουν de novo δείκτες

μεσεγχυματικού κυττάρου (για παράδειγμα τη vimentin, τη nestin, την  $\alpha$ -SMA, την FSP-1 και το κολλαγόνο I και III), τροποποιούν τον κυτταροσκελετό τους, εκφράζουν μικροϊνίδια, αποκτούν κινητικότητα, διασχίζουν τη βασική μεμβράνη του σωληναρίου και φτάνουν στο διάμεσο ιστό, όπου παράγουν και εναποθέτουν εξωκυττάρια ουσία(10, 11, 30, 31).



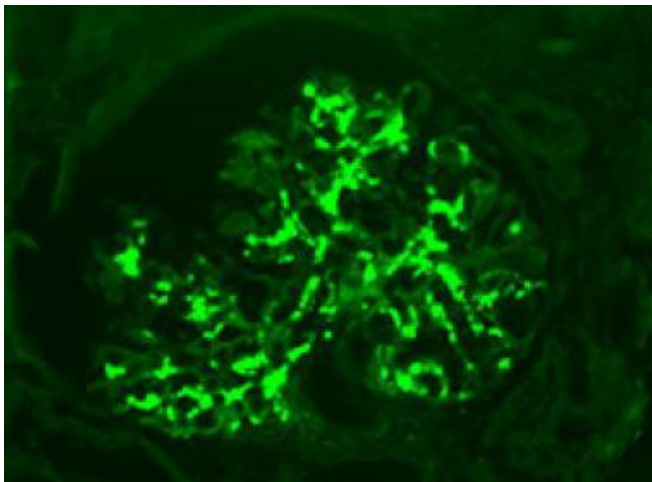
## ΜΕΡΟΣ Ι: ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΝΕΦΡΙΤΙΔΕΣ

#### 4.1 IgA Νεφροπάθεια

##### 4.1.1 Ορισμός:

Η IgA νεφροπάθεια χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση της ανοσοσφαιρίνης IgA κυρίως στο μεσάγγειο, όπως παρατηρείται σε δείγματα βιοψιών. Παράλληλα, μπορεί να παρατηρούνται εναποθέσεις κι άλλων ανοσοσφαιρινών όπως IgG ή IgM. Στο μικροσκόπιο, τα παθολογικά ευρήματα ποικίλουν, από παντελή έλλειψη μέχρι ανάπτυξη σοβαρής διάχυτης σπειραματονεφρίτιδας. Η IgA νεφροπάθεια θεωρείται η συχνότερη πρωτοπαθής σπειραματονεφρίτιδα παγκοσμίως αλλά ο επιπολασμός της δεν δύναται να υπολογιστεί λόγω του γεγονότος ότι ένας σημαντικός αριθμός ασθενών δεν υποβάλλεται σε βιοψία νεφρού λόγω της ήπιας κλινικής εικόνας που εμφανίζει. Παρόλο ότι μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, η εκδήλωσή της είναι συχνότερη στην δεύτερη και Τρίτη δεκαετία της ζωής, με επικράτηση στο άρρεν φύλο (32).



**Εικόνα 6: Μεσαγγειακή εναπόθεση Ανοσοσφαιρίνης Α (IgA):** Ανοσοφθορισμός (400x). Από βιβλιογραφική αναφορά (33)

##### 4.1.2 Παθοφυσιολογία της IgA νεφροπάθειας

Παρότι δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, η IgA νεφροπάθεια χαρακτηρίζεται από ανώμαλη παραγωγή της ανοσοσφαιρίνης IgA ως επακόλουθο διαταραχής της άμυνας των βλεννογόνων του ξενιστή. Κυρίως παρουσιάζεται ως απουσία της

γλυκοζυλίωσης, μιας μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της ανοσοσφαιρίνης IgA. Αυτή η διαταραχή στην γλυκοζυλίωση επηρεάζει την φυσιολογική αποβολή της κυκλοφορούσας IgA του αίματος, με αποτέλεσμα την εναπόθεση της στους νεφρούς(33, 34).

#### 4.1.3 Κλινική πορεία ασθενών με IgA νεφροπάθεια

Η πλειοψηφία των ασθενών, που δεν παρουσιάζουν την σοβαρή μορφή της IgA νεφροπάθεια με εκσεσημασμένη πρωτεϊνουρία και αζωθαιμία, έχουν σχετικά καλή νεφρική λειτουργία. Οι περισσότεροι από αυτούς του ασθενείς θα παρουσιάσουν ένα ή λιγοστά επεισόδια έξαρσης της νόσου, τα οποία θα αποδράμουν χωρίς σοβαρές μακροχρόνιες επιπλοκές στην νεφρική λειτουργία. Παρόλο αυτά, το 1-2% των ασθενών θα καταλήξουν σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο. Η τακτική παρακολούθηση των ασθενών υψηλού κινδύνου, ιδίως αυτών με επίμονη μικροσκοπική αιματουρία και βαριά πρωτεϊνουρία, έδειξε ότι το περισσότερο από το 20-30% των ασθενών θα αναπτύξει νεφρική νόσο τελικού σταδίου δύο δεκαετίες μετά την διάγνωση(33, 34).

#### 4.1.4 Κλινική εικόνα και διάγνωση της IgA νεφροπάθειας

Οι ασθενείς με IgA νεφροπάθεια εμφανίζονται με ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, από ασυμπτωματική μικροσκοπική αιματουρία έως ταχέως εξελισσόμενη νεφρική ανεπάρκεια με σοβαρού βαθμού πρωτεϊνουρία. Λόγω της συσχέτισης της IgA ανοσοσφαιρίνης με μηχανισμούς διαταραχής των βλεννογόνων του ξενιστή, έχει φανεί πως μεγάλο μέρος των ασθενών παρουσιάζει παθολογικά ευρήματα στην γενική ούρων λίγο μετά από πρόσφατη λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος.

Η συχνότερη κλινική εκδήλωση των ασθενών με IgA νεφροπάθεια (40-50% των περιπτώσεων) είναι τα επεισόδια βαριάς αιματουρίας κατά ή λίγο μετά από λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού. Αυτό είναι συχνότερο στα παιδιά παρά στους ενήλικες. Οι ασθενείς, επίσης, μπορεί να εμφανίσουν δυσουρικά ενοχλήματα ή με πυρετό και μυαλγίες, συμπτώματα που παραπέμπουν σε ιογενή λοίμωξη. Αυτοί οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζουν φυσιολογική νεφρική λειτουργία με δύσμορφα ερυθρά ή ερυθροκυτταρικούς κυλίνδρους στην γενική ούρων. Η αμέσως επόμενη συχνότερη κλινική εκδήλωσης (40% των περιπτώσεων) και η πιο συχνή στους ενήλικες είναι η ασυμπτωματική μικροσκοπική αιματουρία με παρουσία δύσμορφων ερυθρών ή ερυθροκυτταρικών κυλίνδρων στην γενική εξέταση των ούρων με ή χωρίς συνοδό πρωτεϊνουρία ή βαριά αιματουρία. Συνήθως η νεφρική λειτουργία είναι

φυσιολογική, αν και μπορεί σταδιακά να επιδεινώνεται. Τέλος, το 20% των ασθενών παρουσιάζει αιματουρία και νεφρωσικό σύνδρομο ή λιγότερο συχνά με νεφριπδικό σύνδρομο και τελικού σταδίου νεφρική νόσο στα πλαίσια μηνοειδούς σπειραματονεφρίτιδας(33).

Η βιοψία νεφρού πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο σε ασθενείς με επίμονα παθολογικά ευρήματα στην γενική εξέταση ούρων, σημαντικού βαθμού πρωτεϊνουρία (>500mg/24ωρο), ή παθολογική τιμή της κρεατινίνης ορού. Τα επίπεδα της IgA ανοσοσφαιρίνης στον ορό μπορεί να είναι υψηλά, αν και αυτό δεν παίζει κανένα ουσιαστικό ρόλο στην διάγνωση(35).

#### 4.1.5 Ταξινόμηση της IgA νεφροπάθειας

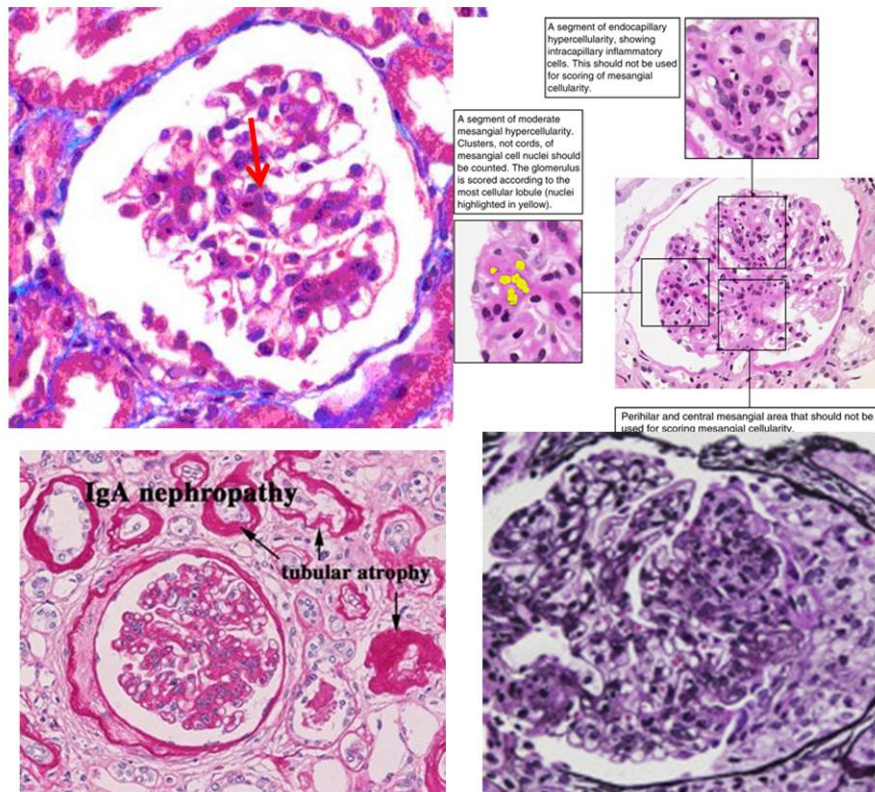
Υπάρχουν 2 τύποι ταξινόμησης της IgA νεφροπάθειας, η ταξινόμηση κατά Oxford και η ταξινόμηση κατά Haas.

Τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται στην Ταξινόμηση κατά Oxford είναι τα εξής(35, 36):

- Μεσαγγειακή υπερπλασία
- Τμηματική σπειραματοσκλήρυνση
- Ενδοτριχοειδική υπερπλασία
- Σωληναριακή ατροφία/ Διάμεση ίνωση

Η ταξινόμηση κατά Haas περιλαμβάνει τις εξής υποτάξεις(37):

- Υποτάξη I: απουσία ή παρουσίας ελάχιστης μεσαγγειακής υπερπλασίας, χωρίς σπειραματοσκλήρυνση
- Υποτάξη II: εστιακή και τμηματική σπειραματοσκλήρυνση χωρίς ενεργό κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- Υποτάξη III: εστιακή πολλαπλασιαστική σπειραματονεφρίτιδα
- Υποτάξη IV: διάχυτη πολλαπλασιαστική σπειραματονεφρίτιδα
- Υποτάξη V: παρουσία στην βιοψία  $\geq 40\%$  σφαιρική σκλήρυνση του σπειράματος ή/και  $\geq 40\%$  υπολογιζόμενη φλοιική σωληναριακή ατροφία ή απώλεια.



**Εικόνα 7: Παθολογοανατομική εικόνα IgA νεφροπάθεια.** Παρατηρείται στο σπείραμα εικόνα μεσαγγειακή υπερπλασίας (κόκκινο βέλος) καθώς και εικόνα σωληνιακής ατροφίας (μαύρο βέλος). Από βιβλιογραφική αναφορά (36).

## 4.2 Μembranώδης Σπειραματονεφρίτιδα

### 4.2.1 Ορισμός

Η μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα είναι μια νεφρική νόσος που χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα ευρήματα στο απλό μικροσκόπιο και στον ανοσοφθορισμό. Στο οπτικό μικροσκόπιο, υπάρχει μία διάχυτη πάχυνση των τοιχωμάτων των σπειραματικών τριχοειδών χωρίς συνοδό αύξηση της κυτταροβρίθειας. Στον ανοσοφθορισμό, υπάρχει διάχυτη κοκκώδης χρώση των βρόγχων (loops) που σχηματίζουν τα σπειραματικά τριχοειδή, το οποίο αφορά σε εναπόθεση κυρίως IgG και C3 και δευτερευόντως IgA και IgM. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, το χαρακτηριστικό της μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας είναι οι παθολογικές

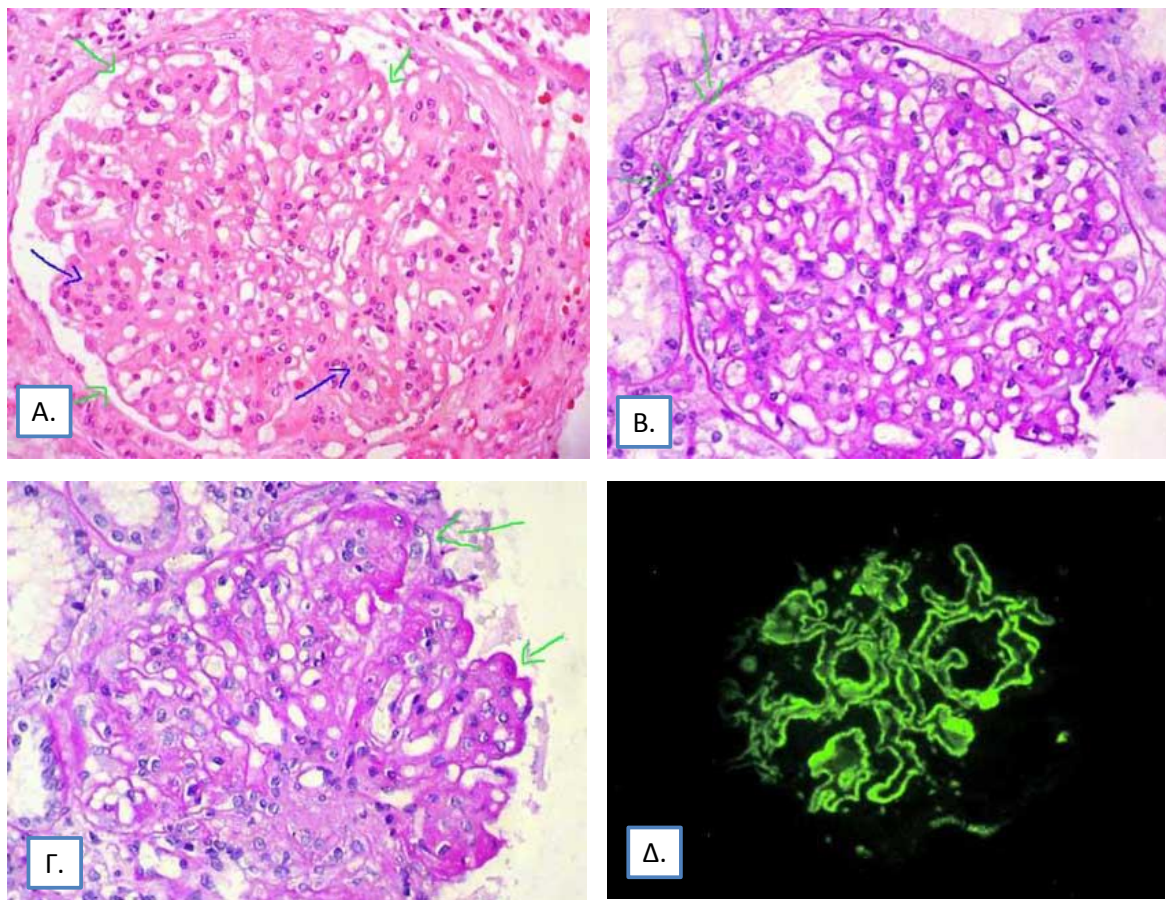
εναποθέσεις στην υποεπιθηλιακή περιοχή της σπειραματικής βασικής μεμβράνης. Αυτές οι εναποθέσεις αντιστοιχούν στις ανοσοσφαιρίνες που φαίνονται στον ανοσοφθορισμό.

Η μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα είναι μία από τις συχνότερες πρωτοπαθής σπειραματοπάθειες που προκαλούν νεφρωσικό σύνδρομο (33% περίπου των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο), με υπεροχή στους άνδρες που έχουν ηλικία > 40 έτη. Η μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια, εκτός από πρωτοπαθής, μπορεί να είναι και δευτεροπαθής αποτελώντας είτε μέρος μίας πολυσυστηματικής νόσου, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος ή η χρόνια ηπατίτιδα Β, είτε παρανεοπλασματική εκδήλωση στα πλαίσια εξωνεφρικών κακοηθειών. Παρότι μπορεί να εμφανιστεί και στα παιδιά, εμφανίζεται κατά κύριο λόγο στους ενήλικες, με αιχμή στην 4<sup>η</sup> έως 5<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής(38, 39).

#### 4.2.2 Παθοφυσιολογία της μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας

Η αιτία της εναπόθεσης ανοσοσφαιρίνης στην υποεπιθηλιακή περιοχή της σπειραματικής βασικής μεμβράνης στη μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα, η αντίστοιχη βλάβη που αυτή προκαλεί καθώς και η διαταραχή στην δομή, την λειτουργία ή και τα δύο, δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Θεωρείται πως συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος που σχηματίζονται *in situ* στην υποεπιθηλιακή περιοχή, πιθανώς ως αποτέλεσμα της ελεύθερης κυκλοφορίας αντισωμάτων που αναγνωρίζουν και συνδέονται σε ένα αντιγόνο του ξενιστή που βρίσκεται στο σπείραμα. Οποιοδήποτε και να είναι το αντιγόνο, φαίνεται ότι, όταν σχηματίζεται το σύμπλεγμα και ενεργοποιεί το συμπλήρωμα, παράγονται πολύ τοξικές ουσίες, όπως για παράδειγμα το C5b-9 σύμπλεγμα εναντίον της μεμβράνης (C5b-9 membrane attack complex). Αποτέλεσμα αυτών είναι η βλάβη των παρακείμενων κυττάρων και οι παθολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στις βιοψίες ασθενών καθώς και οι κλινικές εκδηλώσεις της πρωτεϊνουρίας και την αζωθαιμίας(40, 41).





**Εικόνα 8: Παθολογοανατομικά ευρήματα στην μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα.** Παρατηρούνται αλλαγές στα τοιχώματα των τριχοειδών, τα οποία εμφανίζονται πεπαχυσμένα με πτυχές (πράσινα βέλη). Σε μερικά σημεία παρατηρείται μεσαγγειακή υπερπλασία (μπλε βέλη). Σε αυτή την περίπτωση πρέπει να τεθεί η υποψία δευτεροπαθούς μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας (H&E, X.400) [A]. Με την βοήθεια της χρώσης PAS παρατηρείται η πάχυνση των τριχοειδικών τοιχωμάτων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση απεικονίζεται μία περιοχή με ενδοτριχοειδική υπερπλασία (βέλη). Αυτό το εύρημα μπορεί, επίσης, να υποδηλώνει δευτεροπαθές αίτιο της νόσου. (PAS, X.400) [B]. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται περιοχές τμηματικής σκλήρυνσης. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει χειρότερη πρόγνωση (PAS, X.400) [Γ]. Εικόνα από ανοσοφθορισμό, όπου παρουσιάζονται οι εναποθέσεις IgG ανοσοσφαιρίνης και συμπληρώματος C3 στα τοιχώματα των τριχοειδών και πολλές φορές και στο εξωτερικό τμήμα βασικής μεμβράνης. Σε περίπτωση που βρεθούν υποενδοθηλιακές εναποθέσεις πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο δευτεροπαθούς αιτίου (ανοσοφθορισμός με anti-IgG, x400). (42)

#### 4.2.3 Κλινική πορεία των ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα

Η εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής νόσου στη μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα είναι κατά κανόνα αργή, με τα ποσοστά των ασθενών που καταλήγουν σε νεφρική νόσο τελικού σταδίου να κυμαίνονται περίπου σε 30-40% σε χρονικό διάστημα 10 έως 15 έτη. Παράγοντες που οδηγούς σε αυξημένο κίνδυνο για ταχύτερη εξέλιξη της νόσου είναι η ηλικία >50 έτη, το αρρεν φύλο, πρωτεϊνουρία >8 gr/24ωρο, αυξημένες τιμές κρεατινίνης κατά την εμφάνιση του ασθενούς, και σημαντικότερη βλάβη του διαμεσοσωληναριακού ιστού στην βιοψία(39).

#### 4.2.4 Κλινική εικόνα και διάγνωση της μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας

Παρόλο που οι ασθενείς με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα συνήθως παρουσιάζονται με ασυμπτωματική πρωτεϊνουρία, οι περισσότεροι παρουσιάζουν σημεία και συμπτώματα τυπικά νεφρωσικού συνδρόμου. Πάνω από το 50% των ασθενών έχουν κάποιου βαθμού αρτηριακή υπέρταση κατά την έναρξη της νόσου. Σπανίως, οι ασθενείς θα εμφανίσουν συμπτώματα που οφείλονται στην υπερπηκτικότητα που μπορεί να συνοδεύει το νεφρωσικό σύνδρομο, πιο συχνά μάλιστα εμφανίζουν εν τω βάθει θρόμβωση των κάτω άκρων ή νεφρική φλεβική θρόμβωση. Η νεφρική λειτουργία είναι διατηρημένη συνήθως κατά την εμφάνιση του ασθενούς, εκτός αν η διάγνωση της νόσου διαλάθει για αρκετά χρόνια. Παρότι μόνο 3,5 gr/24ωρο είναι αρκετά για να γίνει η διάγνωση του νεφρωσικού συνδρόμου, οι ασθενείς με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα παρουσιάζουν εκσεσημασμένη πρωτεϊνουρία, με τιμές που αγγίζουν τα 10 έως 20gr/24ωρο. Μικροσκοπική αιματουρία εμφανίζεται σε > 50% των περιπτώσεων, αν και συνήθως απουσιάζουν οι ερυθροκυτταρικοί κύλινδροι και τα δύσμορφα ερυθρά. Παρότι θεωρείται μία ανοσοσυμπλεγματική νόσος, τα επίπεδα του συμπληρώματος C3 και C4 στον ορό παραμένουν φυσιολογικά(39).

Ενήλικες ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο και φυσιολογικές τιμές κρεατινίνης ορού είναι υποψήφιοι για την διάγνωση της μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας, όταν μάλιστα απουσιάζουν τα σημεία ή τα συμπτώματα κάποιας συστηματικής πάθησης. Η νεφρική βιοψία είναι απαραίτητα για την διαφοροδιάγνωση από άλλες σπειραματονεφρίτιδες με παρόμοια κλινική εικόνα. Όλοι οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα από την βιοψία, δικαιούνται να υποβληθούν σε περαιτέρω έλεγχο για τον αποκλεισμό των δευτεροπαθών αιτιών που την προκαλούν(42, 43).

### 4.3 Νεφρίτιδα του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου

#### 4.3.1 Ορισμός

Ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ) είναι ένα αυτοάνοσο πολυσυστηματικό νόσημα με πολύπλοκη παθογένεια. Η νόσος χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι της διπλής έλικας του DNA και άλλων πυρηνικών αντιγόνων καθώς επίσης και έναντι φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Ένα από τα όργανα που προσβάλλει είναι ο νεφρός, με αποτέλεσμα να οδηγεί σε χρόνια νεφρική νόσο(44).

#### 4.3.2 Παθοφυσιολογία και παθολογοανατομική εικόνα της νεφρίτιδας του ΣΕΛ

Σχετικά με την παθογένεια της νόσου έχει παρατηρηθεί ότι η νεφρική βλάβη καθορίζεται από την θέση σχηματισμού των ανοσοεναποθέσεων, οι οποίες οφείλονται κατά κύριο λόγο σε αντισώματα έναντι της διπλής έλικας του DNA που στοχεύουν το νουκλεόσωμα. Οι ανοσοεναποθέσεις στην νεφρίτιδα του ΣΕΛ βρίσκονται σε τρία βασικά σημεία: στο μεσάγγειο, υποενδοθηλιακά και/ή υποεπιθηλιακά στο σπείραμα. Οι εναποθέσεις στο μεσάγγειο και στο υποενδοθηλιακό τμήμα είναι εγγύς της βασικής μεμβράνης του σπειράματος και συνεπώς βρίσκονται σε άμεση επικοινωνία με τον αγγειακό χώρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπληρώματος (μέσω του κλασικού μονοπατιού) με συνοδό παραγωγή των χυμοκινών C3a και C5a και εν συνεχεία την προσέλκυση ουδετεροφίλων και μονοπύρηνων κυττάρων. Αυτές οι αλλαγές εκφράζονται ιστολογικά με την ανάπτυξη μεσαγγειακού τύπου (τμηματικού ή διάχυτου) σπειραματονεφρίτιδα και κλινικά με την δημιουργία ενεργού ιζήματος ούρων, την πρωτεϊνουρία και μερικές φορές ην έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Αν και οι υποεπιθηλιακές εναποθέσεις μπορούν, επίσης να ενεργοποιήσουν το συμπλήρωμα, δεν προκαλείται προσέλκυση των κυττάρων, καθώς οι χυμοκίνες δεν έρχονται σε επαφή με την κυκλοφορία λόγω της παρουσίας της βασικής μεμβράνης. Γι' αυτό τον λόγο η βλάβη είναι περιορισμένη στα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος και η πρώτη κλινική εκδήλωση είναι η πρωτεϊνουρία, η οποία πολλές φορές είναι στα πλαίσια του νεφρωσικού συνδρόμου. Ιστολογικά, η πλειοψηφία των ασθενών αναπτύσσουν μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν είναι όλα τα anti-DNA αυτοαντισώματα νεφροτοξικά. Μελέτες έχουν συγκρίνει ασθενείς με θετικά anti-DNA αυτοαντισώματα και ενεργό νεφρίτιδα και ασθενείς με θετικά αυτοαντισώματα που δεν ανέπτυξαν νεφρίτιδα. Παράλληλα, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν πως αυτοαντισώματα έναντι του C1q συνδέονται με την νεφρίτιδα του λύκου. Τέλος, έχει προταθεί ότι υποομάδες της ανοσοσφαιρίνης IgG



παίζουν καθοριστικό ρόλο στην φλεγμονώδη απάντηση που προκαλείται από τις ανοσοεναποθέσεις(45).

Οι εναποθέσεις, οποιουδήποτε είδους, μπορούν να επηρεάσουν τα σπειράματα είτε διάχυτα (όλα τα σπειράματα), είτε εστιακά (μερικά σπειράματα), είτε τμηματικά (μέρος του σπειράματος). Ο πολλαπλασιασμός (proliferation) είναι ένα από τα πιο βασικά αποτελέσματα των ανοσοεναποθέσεων στην νεφρίτιδα του ΣΕΛ. Πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους των εναποθέσεων και του βαθμού του πολλαπλασιασμού. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία αντι C1q αυτοαντισωμάτων σχετίζεται άμεσα με την προαγωγή του πολλαπλασιασμού στην νεφρίτιδα του ΣΕΛ, τόσο που επί απουσίας των συγκεκριμένων αυτοαντισωμάτων είναι σπάνια η ενεργός φλεγμονή στο νεφρικό παρέγχυμα των ασθενών(45).

Μεγάλη είναι η ποικιλία των ιστολογικών ευρημάτων στην περίπτωση της νεφρίτιδας του λύκου. Κατ' αρχήν, το συνηθέστερο εύρημα είναι η εναπόθεση αντισωμάτων στο μεσάγγειο καθώς και στα τριχοειδή. Επιπλέον, μπορεί να παρατηρηθούν τα εξής: αύξηση της κυτταροβρίθειας στην εξωκυττάρια ουσία και στο μεσάγγειο, συσσώρευση λευκοκυττάρων, πάχυνση του τοιχώματος των τριχοειδών, σπειραματική νέκρωση, δημιουργία θρόμβων υαλίνης (χαρακτηριστικό εύρημα της νεφρίτιδας του λύκου) και σπειραματική σκλήρυνση. Το ιστολογικό εύρημα που θεωρείται παθογνωμονικό της νεφρικής προσβολής της νόσου είναι τα σωματίδια αιματοξυλλίνης(45).

Με βάση την παθολογοανατομική εικόνα στην βιοψία νεφρού καθορίζεται και το στάδιο, σύμφωνα με την Ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας(46):

Τάξη I: απουσία ή παρουσία ελάχιστης βλάβης, χωρίς βλάβες στην χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης ή στον ανοσοφθορισμό, ασυμπτωματικός ασθενής, μπορεί να μην παρουσιάζεται νεφρική νόσος.

Τάξη II (10-20% των περιπτώσεων): ήπιες μεσαγγειακές βλάβες (μεσαγγειοπάθεια), μεσαγγειακές εναποθέσεις, ήπια πρωτεϊνουρία με ποικίλη αιματουρία, φυσιολογική νεφρική λειτουργία.

Τάξη IIA: ήπιες αλλοιώσεις στο οπτικό μικροσκόπιο, παρουσία εναποθέσεων στο μεσάγγειο στον ανοσοφθορισμό.

Τάξη IIB: παρουσία σπειραματικής μεσαγγειακής υπερπλασίας στο οπτικό μικροσκόπιο, παρουσία εναποθέσεων μόνο στην περιοχή του μεσαγγείου, απουσία

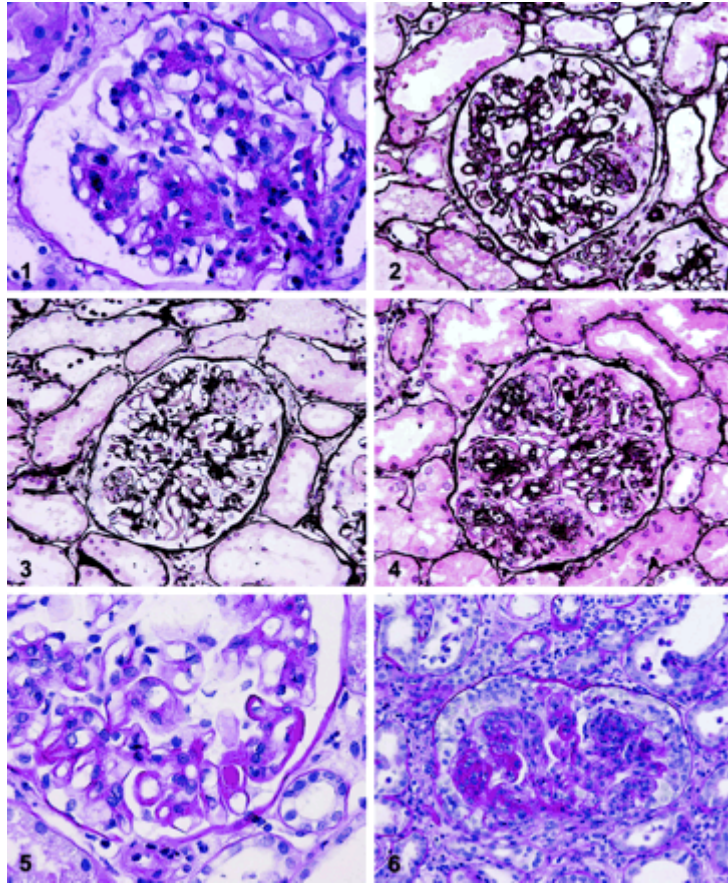
σημαντικής σωληναριακής, διάμεσης ή αγγειακής βλάβης, καλή πρόγνωση (5ετής επιβίωση > 90%)

Τάξη III (30-40% των περιπτώσεων): εστιακή υπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα, εστιακές και τμηματικές υπερπλαστικές ενδο- και εξωτριχοειδικές νεκρωτικές ή σκληρυντικές βλάβες σε <50% του σπειράματος, ανοσοεναποθέσεις κυρίως μεσαγγειακές και υποενδοθηλιακές (ανοσοσφαιρινών, συμπληρώματος), νεφριτιδικό ίζημα ούρων, ποικίλη πρωτεϊνουρία συνήθως μη νεφρωσικού τύπου

Τάξη IV (40-60%): διάχυτη υπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα, με κυρίως σφαιρικές υπερπλαστικές περιοχές, νέκρωση, παρουσία μηνοειδών σχηματισμών σε >50% του σπειράματος, ποικίλη σκλήρυνση, κυρίαρχη φλεγμονώδης διάμεση διήθηση, παρουσία βλαβών τύπου βρόγχου στα πεπαχυσμένα τριχοειδικά τοιχώματα, παρουσία κυρίως μεσαγγειακών και υπενδοθηλιακών ανοσοεναποθέσεων IgG, συχνά και IgM και IgA, C3 και C1q, ινικής και ινωδογόνου, νεφριτιδικό και νεφρωσικό σύνδρομο, υπέρταση, νεφρική ανεπάρκεια που ποικίλλει από ήπια έως ταχέως εξελισσόμενη χωρίς προσδόκιμο επιβίωσης.

Τάξη V (10-15%): μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα, διάχυτη πάχυνση των τοιχωμάτων των τριχοειδων, υποεπιθηλιακές και μεσαγγειακές ανοσοεναποθέσεις (πρότυπο “spike and dome”), νεφρωσικό σύνδρομο ή σοβαρή πρωτεϊνουρία

Τάξη VI: προχωρημένη σκληρυντική σπειραματονεφρίτιδα, σπειραματική απώλεια και τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, σωληναριακή ατροφία, διάμεση ίνωση, λίγες ανοσοεναποθέσεις, χρόνια νεφρική νόσος που δεν ανταποκρίνεται στην θεραπεία.



**Εικόνα 9: Παθολογοανατομικά ευρήματα στη νεφρίτιδα του ΣΕΛ.** (1) Νεφρίτιδα του ΣΕΛ τάξης IV. Παρουσία σπειράματος με σφαιρική ενδοτριχοειδική υπερπλασία. (2) Νεφρίτιδα του ΣΕΛ τάξης IV. Σπείραμα με διάχυτες υποενδοθηλιακές ανοσοεναποθέσεις, βλάβες δίκην βρόγχου (wireloop lesions). (3) Νεφρίτιδα του ΣΕΛ τάξης V. Παρουσία σπειράματος με τελικού σταδίου μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα λύκου, η οποία χαρακτηρίζεται από μαζικές υποεπιθηλιακές συγκεντρώσεις ανοσοεναποθέσεων. (4) Νεφρίτιδα του ΣΕΛ τάξης IV και V. Μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα του λύκου με υποεπιθηλιακούς σχηματισμούς δίκην ακίδας, σε συνδυασμό διάχυτη ενδοτριχοειδική και μεσαγγειακή υπερπλασία, πρόωμη δημιουργία μηνοειδών σχηματισμών και μεσαγγειακής και τριχοειδικής σκλήρυνσης. (5) Νεφρίτιδα του ΣΕΛ τάξης VI. Ο νεφρικός φλοιός παρουσιάζει διάχυτη σφαιρική σπειραματοσκλήρυνση, ενώ παράλληλα παρουσιάζεται διάμεση ίνωση και αγγειακή σκλήρυνση. (6) Σπείραμα με σοβαρή τριχοειδική και αρτηριακή θρόμβωση, οίδημα και νέκρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Χωρίς σημεία ανοσοεναποθέσεων.(46)

#### 4.3.3 Κλινική πορεία των ασθενών με νεφρίτιδα του ΣΕΛ

Η νεφρίτιδα είναι συχνή σε ασθενείς με ΣΕΛ, καθώς παρουσιάζεται στα  $\frac{3}{4}$  των ασθενών κάποια στιγμή κατά την διάρκεια της νόσου και μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε τμήμα του νεφρού. Η προσβολή των νεφρών από ΣΕΛ είναι αυτή που

επιφέρει και την χειρότερη πρόγνωση. Η πλειονότητα των ασθενών με μεσαγγειακή ή ήπια εστιακή τμηματική υπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα διατηρούν καλή νεφρική λειτουργία, ενώ οι ασθενείς με διάχυτη υπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα αναπτύσσουν νεφρική ανεπάρκεια, αν δεν υποβληθούν σε θεραπευτική αγωγή(44).

#### 4.3.4 Κλινική εικόνα και διάγνωση της νεφρίτιδας του ΣΕΛ

Η πιο συχνή διαταραχή που παρατηρείται είναι η πρωτεϊνουρία. Η νόσος μπορεί να καταλήξει σε νεφρωσικό σύνδρομο και νεφρική ανεπάρκεια ή να περιορίζεται σε ασήμαντη λευκωματουρία ή μικροσκοπική αιματουρία ή κυλινδρουρία.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι νεφρικής νόσου στον ΣΕΛ, οι οποίοι διαφοροδιαγιγνώσκονται με την βιοψία νεφρού. Ο πιο συχνός είναι ο διαμεσολαβούμενος από ανοσοσυμπλέγματα(44).

### **4.4 Σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας**

#### 4.4.1 Ορισμός

Οι αγγειίτιδες που σχετίζονται με τα ANCA (Anti-neutrophil cytoplasmic antibody), στις οποίες συγκαταλέγονται κυρίως η κοκκιωμάτωση Wegener και η μικροσκοπική αγγειίτιδα, προσβάλλουν τους νεφρούς αρκετά συχνά. Η σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας χαρακτηρίζεται στον ανοσοφθορισμό από μικρή ή μηδενική εναπόθεση ανοσοσφαιρινών ή συμπληρώματος στο σπείραμα, το επονομαζόμενο pauci-immune πρότυπο. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατηρούνται υποενδοθηλιακό οίδημα, μικροθρομβώσεις, αποκοκκίωση των ουδετεροφίλων, αλλά απουσιάζουν οι ανοσοεναποθέσεις. Στο οπτικό μικροσκόπιο παρουσιάζεται η εικόνα της νεκρωτικής σπειραματονεφρίτιδας με μηνοειδείς σχηματισμούς(47).

#### 4.4.2 Παθοφυσιολογία και ιστολογική εικόνα των σπειραματονεφρίτιδων στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας

Η ιστολογική εικόνα των σπειραματονεφρίτιδων που σχετίζονται με τις ANCA αγγειίτιδες περιλαμβάνει ένα μεγάλο φάσμα ευρημάτων. Στην κοκκιωμάτωση με πολυαγγειίτιδα (πρώην κοκκιωμάτωση Wegener), μια αγγειίτιδα που χαρακτηρίζεται από κοκκιωματώδη φλεγμονή και γεωγραφική νέκρωση, παρατηρείται τμηματική νεκρωτική σπειραματονεφρίτιδα με πολλαπλούς μηνοειδείς σχηματισμούς. Από παθολογοανατομικής πλευράς, χαρακτηρίζεται ως ανοσοπενική

σπειραματονεφρίτιδα, λόγω της σχετικής έλλειψης των αυτοαντισωμάτων εντός του σπειράματος. Η μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα προσβάλλει συχνά τα τριχοειδή του νεφρού, αποτελεί την πιο συχνή αιτία πνευμονο-νεφρικού συνδρόμου και προκαλεί τμηματική νεκρωτική σπειραματονεφρίτιδα συχνά με παρουσία ενδοσπειραματικών θρόμβων. Τέλος, η βιοψία νεφρού στην πορφύρα Henoch-Schönlein αποκαλύπτει τμηματική σπειραματονεφρίτιδα με μηνοειδείς σχηματισμούς και μεσαγγειακή εναπόθεση IgA(48).

#### 4.4.3 Κλινική πορεία των ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας

Η νεφρική συμμετοχή της συγκεκριμένης κατηγορίας νόσου αποτελεί και τον βασικότερο παράγοντα κινδύνου για θνητότητα και θνησιμότητα. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες οι οποίες προσπάθησαν να ανακαλύψουν τους καλύτερους (κλινικούς και ιστολογικούς) δείκτες για την πρόγνωση της νόσου. Έχει φανεί πως ο συνδυασμός του GFR και των ιστολογικών ευρημάτων από την βιοψία αποτελούν τον βέλτιστο προγνωστικό δείκτη παρακολούθησης των ασθενών. Συγκεκριμένα, σχετικά με τα ιστολογικά ευρήματα, το ποσοστό των φυσιολογικών (ανέπαφων από τη νόσο) σπειραμάτων σε μία βιοψία αποτελεί τον ισχυρότερο προγνωστικό δείκτη έκβασης της νόσου. Σε σχέση με αυτό, και το υψηλό ποσοστό σφαιρικά σκληρωσμένων σπειραμάτων έχει συνδεθεί, επίσης, με την πρόγνωση της νεφρικής συμμετοχής στις ANCA αγγειίτιδες. Εκτός όμως, από τις σπειραματικές βλάβες, χαρακτηριστικό της νόσου που σχετίζεται και με την έκβαση των ασθενών αποτελούν και οι διαμεσοσωληναριακές βλάβες, οξείες ή χρόνιες. Η σωληναριακή ατροφία, μάλιστα, αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για επηρεασμένη νεφρική λειτουργία, όπως παρατηρείται κατά την διάρκεια παρακολούθησης των ασθενών. Σχετικά με τις αγγειακές διαταραχές, αρτηριοσκλήρυνση στην αρχική βιοψία έχει χαρακτηριστεί, επίσης, βασικός παράγοντας κινδύνου για αιμοδιύλιση στο μέλλον(49-51).

#### 4.4.4 Κλινική εικόνα και διάγνωση των σπειραματονεφρίτιδων στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας

Παρότι η ταχέως εξελισσόμενη νεφρική νόσος τελικού σταδίου σε ασθενείς με θετικά ANCA διαγνωσμένα είτε με έμμεσο ανοσοφθορισμό είτε με ELISA είναι ενδεικτική της σπειραματονεφρίτιδας που συνδέεται με ANCA αντισώματα, η νεφρική βιοψία με τις μορφολογικές αλλοιώσεις της νόσου αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για την διάγνωση της σπειραματονεφρίτιδας στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας. Αξίζει να σημειωθεί, πως σε πολλές περιπτώσεις σπειραματονεφρίτιδων από ANCA αγγειίτιδες περιγράφονται

και αλλοιώσεις από άλλες παθήσεις που εμφανίζονται παράλληλα με αυτές, όπως η διαβητική νεφροπάθεια, η νεφρίτιδα του λύκου και η μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια(52).

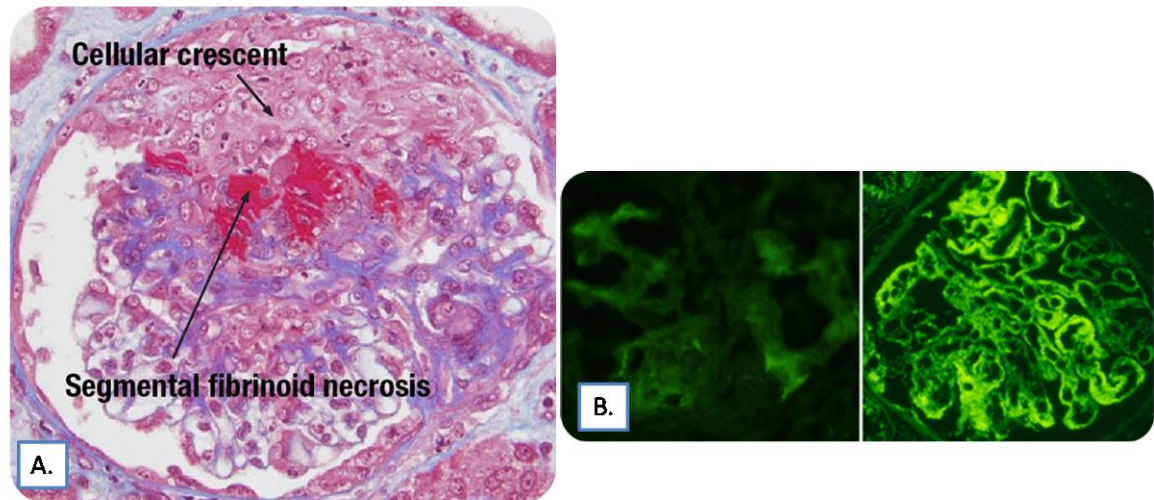
#### 4.4.5 Προτεινόμενη ταξινόμηση των σπειραματονεφρίτιδων στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας

Η ταξινόμηση που έχει προταθεί βασίζεται στα παθολογικά ευρήματα που παρουσιάζονται στο οπτικό μικροσκόπιο. Για να θεωρηθεί αξιόπιστη η βιοψία, θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον 10 ολόκληρα σπειράματα. Ουσιαστικά, υπάρχουν 4 κατηγορίες στην συγκεκριμένη ταξινόμηση: εστιακή, μηννοειδής, σκληρυντική και μικτή. Ο χαρακτηρισμός των 3 πρώτων κατηγοριών βασίζεται στην παρουσία φυσιολογικών σπειραμάτων, κυτταρικών μηννοειδών σχηματισμών και σφαιρικά σκληρυσμένων σπειραμάτων αντίστοιχα, όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα 4. Η τέταρτη κατηγορία, η μικτή σπειραματονεφρίτιδα, αποτελεί μία ετερογενή ομάδα, στην οποία κανένα από τα παραπάνω πρότυπα δεν υπερισχύει σε σχέση με τα υπόλοιπα(53).

**Πίνακας 4: Ταξινόμηση των σπειραματονεφρίτιδων στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας**

Τάξη	Κριτήρια
<b>Εστιακή (Focal)</b>	≥ 50% φυσιολογικά σπειράματα
<b>Μηννοειδής (Crescentic)</b>	≥ 50% σπειράματα με κυτταρικούς μηννοειδείς σχηματισμούς
<b>Μικτή (Mixed)</b>	< 50% φυσιολογικό, < 50% μηννοειδείς σχηματισμού, < 50% σφαιρικά σκληρυσμένα σπειράματα
<b>Σκληρυντική (Sclerotic)</b>	≥ 50% σφαιρικά σκληρυσμένα σπειράματα

Από βιβλιογραφική αναφορά (53)



**Εικόνα 10: Παθολογοανατομική εικόνα σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας. Παρουσία κυτταρικών μηνσείδων σχηματισμών και τμηματικής ινιδειδούς νέκρωσης [A]. Εικόνα στον ανοσοφθορισμό [B]. Από βιβλιογραφική αναφορά (53)**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ 14-3-3

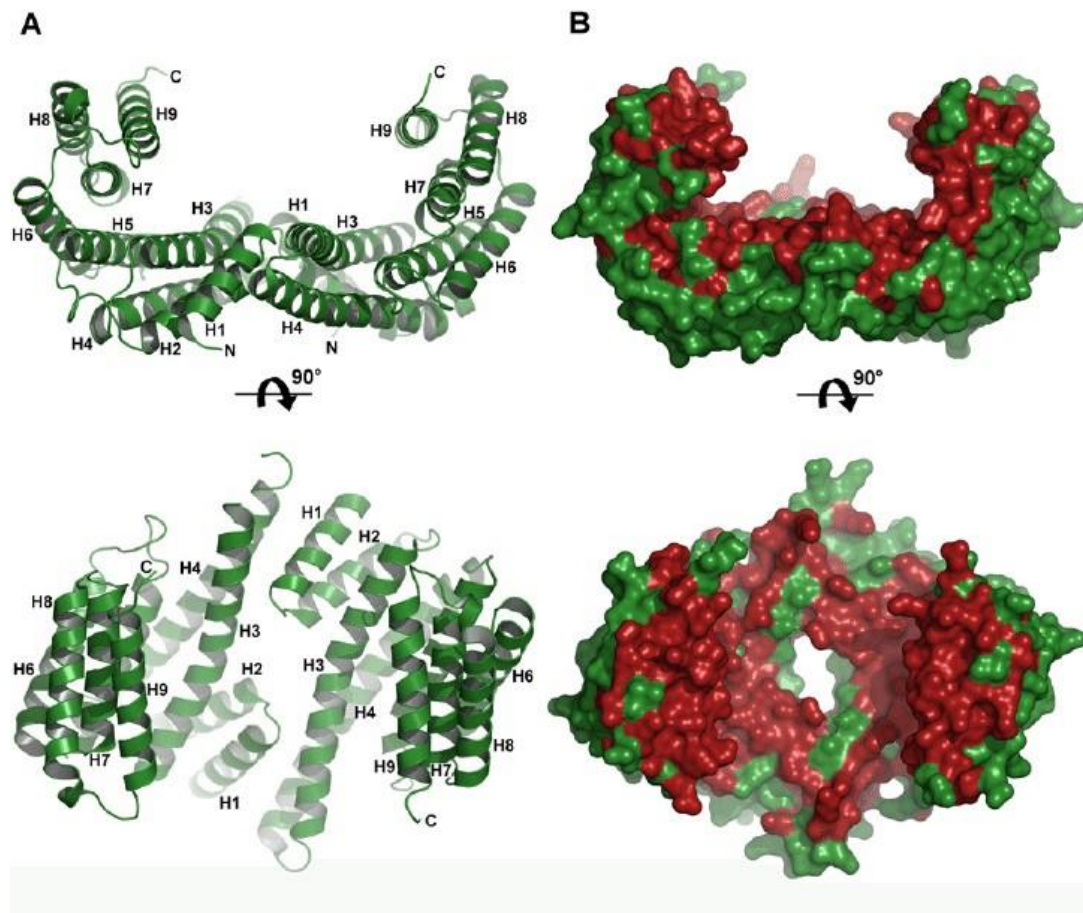
**5.1 Τι είναι οι πρωτεΐνες 14-3-3;**

Οι πρωτεΐνες 14-3-3 είναι μία οικογένεια, συντηρημένων κατά την εξέλιξη, όξινων πρωτεϊνών, μοριακού βάρους 28-33 kDa που εκφράζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες 14-3-3, που είναι όπως προαναφέρθηκε εξαιρετικά συντηρημένες, εκφράζονται στους διάφορους οργανισμούς με ποικίλες ισομορφές. Ενώ στους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως είναι οι μύκητες, υπάρχουν μόνο δύο γονίδια που εκφράζουν τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες, στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν περισσότερα από 15 γονίδια που εκφράζουν τις 14-3-3. Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί 7 ισομορφές του γονιδίου (β,ε,η,γ,τ,ζ και σ). Με εξαίρεση την ισομορφή σ, όλες οι υπόλοιπες ισομορφές έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ομο- και ετεροδιμερή. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 δεσμεύονται σε συγκεκριμένα μοτίβα πρωτεϊνικών στόχων, με αποτέλεσμα να συμμετέχουν σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια αλλά και να δημιουργούν πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Εξαιτίας της πληθώρας και της ποικιλομορφίας των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν, οι πρωτεΐνες 14-3-3 εμπλέκονται στη ρύθμιση και στο συντονισμό πολλών κυτταρικών διεργασιών, για παράδειγμα στον κυτταρικό κύκλο, στην απόπτωση, στον κυτταρικό μεταβολισμό, στη μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στην απάντηση του κυττάρου στη βλάβη του DNA και σε πολλές άλλες (54, 55).

**5.2 Δομή πρωτεϊνών 14-3-3**

Οι πρωτεΐνες 14-3-3 είναι διμερείς και ιδιαίτερα ελικοειδείς πρωτεΐνες. Το κάθε μονομερές αποτελείται από μια δεσμίδα 9 αντιπαράλληλων α-ελίκων (H1-H9) που οργανώνονται σε ένα καρβοξυτελικό και ένα αμινοτελικό άκρο. Η κοίλη επιφάνεια του μονομερούς, που σχηματίζεται από τις α-έλικες H3, H5, H7 και H9, εμφανίζει μία αύλακα μέσα στην οποία δεσμεύεται ο προσδέτης, δηλαδή ο πρωτεϊνικός στόχος. Το διμερές μόριο έχει κυπελλοειδές σχήμα με ένα μεγάλο κεντρικό κανάλι (εικόνα). Το καρβοξυτελικό άκρο εμφανίζει μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των ισομορφών και λειτουργεί ως αναστολέας της αλληλεπίδρασης με ακατάλληλο πρωτεϊνικό στόχο. Το αμινοτελικό άκρο είναι επίσης μεταβλητό και, τα κατάλοιπά του είναι απαραίτητα για τη δημιουργία διμερών (54, 56).





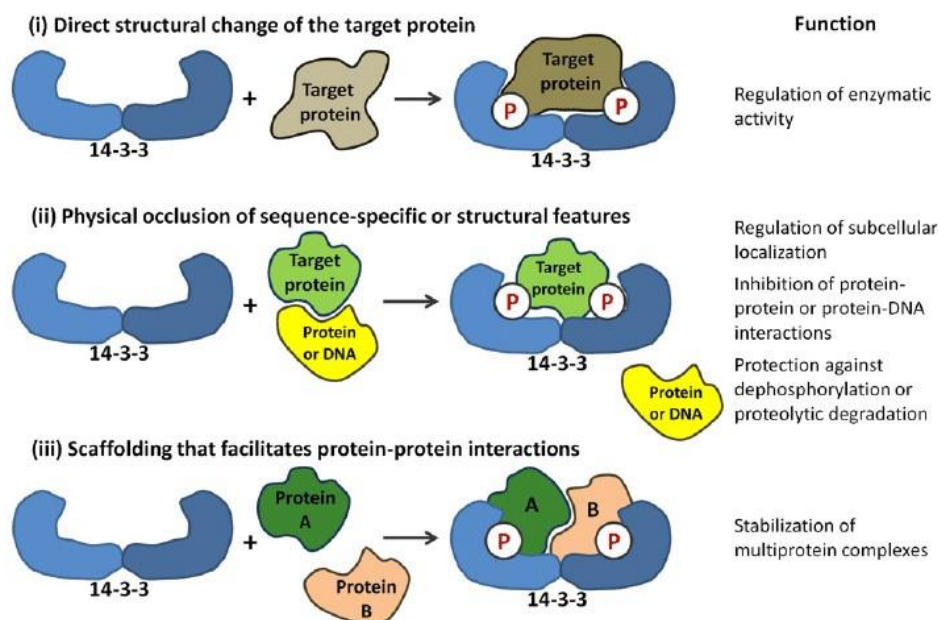
**Εικόνα 11: Δομή 14-3-3 πρωτεϊνών.** Από βιβλιογραφική αναφορά (54).

Χάρη στην δομική γενωμική, γνωρίζουμε σήμερα την δομή και των 7 ισομορφών της 14-3-3 στα θηλαστικά. Παρόλο που η δομή τους είναι παρόμοια, η συγκριτική ανάλυση τους έδειξε ότι παρουσιάζουν σημαντικές δομικές διαφοροποιήσεις, οι οποίες προσδίδουν ελαστικότητα στο διμερές και διευκολύνουν την σύνδεση των 14-3-3 με προσδέτες διαφορετικού μεγέθους και σχήματος (54).

### 5.3 Μηχανισμός δράσης πρωτεϊνών 14-3-3

Μέσω πολλαπλών μελετών που διενεργήθηκαν τα τελευταία 20 χρόνια, αποδείχτηκε ότι οι πρωτεΐνες 14-3-3 συμμετέχουν σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών. Τα δεδομένα από αυτές τις βιοχημικές και δομικές μελέτες επέτρεψαν την ταξινόμηση των λειτουργικών ρόλων των πρωτεϊνών 14-3-3 βάσει του μηχανισμού δράσης τους, σε τρεις βασικές κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι πρωτεΐνες 14-3-3, οι οποίες προκαλούν άμεση δομική τροποποίηση του πρωτεϊνικού στόχου. Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από τις πρωτεΐνες 14-3-3, που με την φυσική τους παρουσία, παρεμποδίζουν και

επικαλύπτουν συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά ή συγκεκριμένες αλληλουχίες του πρωτεϊνικού στόχου. Η τρίτη κατηγορία είναι αυτή στην οποία οι πρωτεΐνες 14-3-3 λειτουργούν ως «μοριακές πλατφόρμες» πάνω στις οποίες οι πρωτεϊνικοί στόχοι έρχονται σε επαφή ο ένας με τον άλλο(54) (εικόνα 12).



**Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης 14-3-3 πρωτεϊνών.** Από βιβλιογραφική αναφορά (54).

Η μελέτη των συμπλεγμάτων των πρωτεϊνών 14-3-3 έφερε στο φως τα χαρακτηριστικά εκείνα που προσδίδουν στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες την ικανότητα να συνδέονται και να ρυθμίζουν τα μόρια-προσδέτες. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι: 1) η άκαμπτη δομή του 14-3-3 πρωτεϊνικού διμερούς, 2) η αυξημένη συχνότητα παρουσίας πολλαπλών μορίων που συνδέονται στις πρωτεΐνες 14-3-3 και προσδέονται σε ένα μόριο-στόχο και 3) η συχνότητα παρουσίας των μορίων που συνδέονται με τις 14-3-3 σε διαταραγμένες περιοχές. Η συσχέτιση των πρωτεϊνών 14-3-3 με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους συνήθως εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση του πρωτεϊνικού στόχου. Επίσης, με τα πιο πρόσφατα δεδομένα φαίνεται ότι, η φωσφορυλίωση αλλά και οι άλλες τροποποιήσεις των ίδιων των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών ρυθμίζουν τόσο την αλληλεπίδραση όσο και το διμερισμό τους. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών 14-3-3 που καθορίζουν τη δράση τους είναι η ακετυλίωση, η πολυγλυκοζυλίωση, η οξειδωση, η πρωτεόλυση και άλλες(54).

### 5.3.1 Δομική τροποποίηση του πρωτεϊνικού στόχου

Στον συγκεκριμένο τρόπο δράσης και ρύθμισης των πρωτεϊνών 14-3-3, η δέσμευση του πρωτεϊνικού στόχου από τις 14-3-3 ακολουθείται από τη δομική τροποποίησή τους. Η αναδιοργάνωση του πρωτεϊνικού στόχου επιτρέπει την ιδανική δέσμευσή του από τρίτες πρωτεΐνες, αυξάνοντας τη συγγενειά του με αυτές. Ένα σημαντικό παράδειγμα πρωτεϊνικού στόχου της περίπτωσης αυτής αποτελεί η ενεργοποίηση του ενζύμου AANAT από τις 14-3-3. Η φωσφορυλίωση του ενζύμου από τις 14-3-3 οδηγεί σε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου, μέσω αύξησης της συγγενειας αυτού με το υπόστρωμά του. Άλλα παραδείγματα αποτελούν οι υδροξυλάσες της τρυπτοφάνης και τυροσίνης, οι κινάσες Raf, η κινάση ASK1, η φυτική μεμβρανική H<sup>+</sup>-ATPάση, η φυτική νιτρική ρεδοукτάση κ.α.(54, 57).

### 5.3.2 Παρεμπόδιση δομικών αλληλουχιών του πρωτεϊνικού στόχου

Οι πρωτεΐνες 14-3-3 έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τροποποιήσεις του πρωτεϊνικού στόχου ή να επικαλύπτουν αλληλουχίες μέσω των οποίων ο πρωτεϊνικός στόχος θα αλληλεπιδρούσε είτε με άλλη πρωτεΐνη είτε με το DNA.

#### 5.3.2.1 Επικάλυψη θέσεων αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με πρωτεΐνη

Έχει φανεί ότι οι πρωτεΐνες 14-3-3 μπορούν να τροποποιούν, σε αρκετές περιπτώσεις, την υποκυττάρια κατανομή και θέση των πρωτεϊνικών τους στόχων. Εάν ο πρωτεϊνικός στόχος εμφανίζει είτε αλληλουχία πυρηνικής εντόπισης (Nuclear Localization Sequence, NLS) είτε αλληλουχία εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Sequence, NES) κοντά σε μοτίβο δέσμευσης των 14-3-3 πρωτεϊνών τότε, η πρωτεΐνη 14-3-3 μπορεί να παρέμβει στη λειτουργία των αλληλουχιών αυτών. Η επικάλυψη των αλληλουχιών αυτών τροποποιεί την κινητική της μετακίνησης της πρωτεΐνης-στόχου και, επομένως, τροποποιεί την εντόπιση του πρωτεϊνικού στόχου είτε προς το κυτταρόπλασμα είτε προς τον πυρήνα. Πρωτεϊνικοί στόχοι αυτής της περίπτωσης είναι οι πρωτεΐνες FOXO, μία υποομάδα μεταγραφικών παραγόντων που παίζουν κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην διαφοροποίηση, στο κυτταρικό μεταβολισμό και στην κυτταρική απάντηση στο στρες και στην απόπτωση. Άλλο παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεΐνες RGS (Regulator of G protein signaling). Ανάλογος μηχανισμός παρατηρείται και στη ρύθμιση της εντόπισης μιας πρωτεΐνης στόχου είτε προς το κυτταρόπλασμα είτε προς το ενδοπλασματικό δίκτυο (54, 58).

### 5.3.2.2 Επικάλυψη θέσεων αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με DNA

Υπάρχουν μεταγραφικοί παράγοντες που περιλαμβάνουν μοτίβα δέσμευσης των 14-3-3 πρωτεϊνών τα οποία συνορεύουν με την περιοχή πρόσδεσής τους στο DNA, με αποτέλεσμα η δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα στις 14-3-3 πρωτεΐνες επιδρά στις ιδιότητες δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA. Από μελέτες βιοφυσικής βασισμένες στην τεχνική FRET, φάνηκε η άμεση φυσική επαφή των 14-3-3 με την επιφάνεια δέσμευσης DNA του μεταγραφικού παράγοντα FOXO4 (54, 59).

### 5.3.2.3 Παρεμπόδιση αποφωσφορυλίωσης ή πρωτεόλυσης του πρωτεϊνικού στόχου

Μια άλλη λειτουργία των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι η ικανότητά τους να προστατεύουν τον πρωτεϊνικό τους στόχο από την αποφωσφορυλίωση ή την πρωτεολυτική του αποδόμηση. Η αποφωσφορυλίωση κάποιων πρωτεϊνών μπορεί να τις οδηγήσει προς την αποδόμησή τους. Επομένως, η παρουσία των 14-3-3 πρωτεϊνών μπορεί να καθορίσει τη μοίρα των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών είτε προς την αποδόμηση είτε προς την ανακύκλωσή τους. Παραδείγματα πρωτεϊνικών στόχων αυτής της κατηγορίας είναι ο FOXO3, η υδροξυλάση της τυροσίνης και άλλοι (54, 59).

### 5.3.3 «Μοριακή πλατφόρμα» για γεινίαση πρωτεϊνών

Οι διμερείς 14-3-3 πρωτεΐνες λειτουργούν ως «μοριακές πλατφόρμες» πάνω στις οποίες οι δύο πρωτεϊνικοί στόχοι πλησιάζουν ο ένας τον άλλο. Το διμερές, που εμφανίζει δύο αντιπαράλληλες αύλακες πρόσδεσης, μπορεί ταυτόχρονα να δεσμεύσει δύο πρωτεΐνες στόχους μέσα στο κεντρικό του κανάλι, δημιουργώντας μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Παράδειγμα της περίπτωσης αυτής είναι η δέσμευση του διμερούς των 14-3-3 πρωτεϊνών σε δύο μόρια H<sup>+</sup>-ATPase ώστε να ενεργοποιηθούν, αλλά και η δέσμευση των 14-3-3 πρωτεϊνών στον μεταγραφικό παράγοντα p53 ώστε να γίνει τετραμερής. Επίσης, οι 14-3-3 πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ως «μοριακές πλατφόρμες» πάνω στις οποίες γίνεται αλληλεπίδραση δύο διαφορετικών πρωτεϊνικών στόχων. Παράδειγμα αυτής της περίπτωσης είναι η αλληλεπίδραση, μέσω των 14-3-3 πρωτεϊνών, της β-Catenin με τον ανταγωνιστή της Cby. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 σταθεροποιούν το σύμπλοκο β-Catenin – Cby, με αποτέλεσμα την έξοδο της β-Catenin από τον πυρήνα και τον τερματισμό της σηματοδότησής της (54, 60, 61)

## 5.4 Λειτουργίες πρωτεϊνών 14-3-3

Η αναστρέψιμη φωσφορυλίωση αποτελεί μια από τις σημαντικότερες και περισσότερο μελετημένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που διαδραματίζει

καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών διεργασιών. Η φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης τροποποιεί τις πρωτεϊνικές λειτουργίες είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω δημιουργίας πρωτεϊνικών συμπλόκων. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 ήταν τα πρώτα μόρια που αναγνωρίστηκαν ως μόρια που δεσμεύουν μοτίβα που περιέχουν φωσφοσερίνη/φωσφοθρεονίνη (pSer/pThr) και, το γεγονός αυτό συνέβαλε στην αναγνώριση του ρόλου τους στην κυτταρική σηματοδότηση. Η οικογένεια των 14-3-3 πρωτεϊνών αλληλεπιδρά με ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών στο οποίο περιλαμβάνονται μεταγραφικοί παράγοντες, βιοσυνθετικά ένζυμα, κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, σηματοδοτικά μόρια, αποπτωτικοί παράγοντες και ογκοκατασταλτικά μόρια. Εξαιτίας, επομένως, της πληθώρας και της ποικιλομορφίας των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρούν, οι πρωτεΐνες 14-3-3 διαπιστώθηκε ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση και στο συντονισμό πολλών κυτταρικών διεργασιών, για παράδειγμα στην κυτταρική ανάπτυξη, στην κυτταρική μετανάστευση, στην απόπτωση, στον κυτταρικό μεταβολισμό, στη μετακίνηση πρωτεϊνών στο κύτταρο, στη μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στην απάντηση του κυττάρου στη βλάβη του DNA και σε πολλές άλλες(62, 63). Σε απάντηση σε διαφορετικά ερεθίσματα, οι πρωτεΐνες 14-3-3 ενορχηστρώνουν την κυτταρική ροή σημάτων μέσω πολύπλοκων δικτύων μοριακών αλληλεπιδράσεων ώστε να διατηρηθεί η φυσιολογία. Η παθολογική έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 ή η διαταραχή της αλληλεπίδρασής τους με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους συνεισφέρει στην εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων(64).

### **5.5 Ο ρόλος των πρωτεϊνών 14-3-3 στην κυτταρική ανάπτυξη, επιβίωση και διαφοροποίηση**

Οι πρωτεΐνες 14-3-3 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ανάπτυξης, της επιβίωσης και της διαφοροποίησης του κυττάρου. Αυτή η αποστολή τους επιτυγχάνεται με ποικίλους μηχανισμούς. Καταρχήν, ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τον Raf-1 στο μονοπάτι Raf-1/ERK, ένα εξωκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι εξαρτώμενο από κινάσες. Σε αυτό συμμετέχουν ποικίλοι παράγοντες, όπως αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες και μιτογόνα μόρια που διεγείρουν την δραστηριότητα των εξωκυττάρων κινάσων ERK-1 και ERK-2. Οι ERK-1/ERK-2 ενεργοποιούνται από τις πρωτεϊνικές κινάσες MEK-1 και MEK-2, οι οποίες με την σειρά τους ενεργοποιούνται από τον Raf-1 (MAP3K). Η ρύθμιση του Raf-1 από τις πρωτεΐνες 14-3-3 είναι γνωστό φαινόμενο, αλλά ο ακριβής μηχανισμός είναι περίπλοκος και βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση. Όλες οι ισομορφές του Raf περιλαμβάνουν δύο θέσεις σύνδεσης με τις 14-3-3. Αντίστοιχα, οι 14-3-3 έχουν κι αυτές δύο θέσεις σύνδεσης στην ίδια πρωτεΐνη και μάλιστα η μία εν των δύο αποτελεί την κύρια θέση σύνδεσης. Σε μη καθορισμένα κύτταρα, η κύρια θέση είναι

φωσφορυλιωμένη, ενώ η δεύτερη θέση δεν είναι. Σε αυτά, ο Raf-1 δεν διαθέτει την ικανότητα να προωθεί σταθερές αλληλεπιδράσεις Raf-1/14-3-3. Έτσι, κάθε 14-3-3 διμερές είναι συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη-στόχο μόνο μέσω της μίας θέσης. Όταν η δεύτερη θέση στον Raf-1 είναι επίσης φωσφορυλιωμένη, μπορεί να συνδεθεί γρήγορα με την πρωτεΐνη-στόχο, λόγω της έντονης εγγύτητας. Στα μη καθορισμένα κύτταρα, λοιπόν, που η μία θέση του Raf-1 δεν είναι φωσφορυλιωμένη, οι 14-3-3 δεν μπορούν να συνδεθούν στο N-τελικό άκρο του Raf-, ώστε να επιτραπεί η μετακίνηση του Raf-1 στην περιοχή της πλασματικής μεμβράνης ώστε να ενεργοποιηθεί. Όταν, όμως και οι δύο θέσεις είναι φωσφορυλιωμένες, οι πρωτεΐνες 14-3-3 θα συνδεθούν το N-τελικό τμήμα του Raf-1 με αποτέλεσμα την δομική αλλαγή του. Με λίγα λόγια, οι πρωτεΐνες 14-3-3 επιδρούν στον παράγοντα Raf-1, αναστέλλοντας την μετακίνηση του στην πλασματική μεμβράνη. Αυτό με την σειρά του αναστέλλει το σήμα Ras στο σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών (65, 66).

Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο οι πρωτεΐνες 14-3-3 ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση είναι μέσω ρύθμισης της κινάσης BMK1 (mitogen-activated kinase-1), ένα μόριο που ανήκει στην οικογένεια των MAP κινασών και το οποίο προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση. Πρόσφατα, φάνηκε πως η ισομορφή 14-3-3β παίρνει μέρος στην ρύθμιση της BMK1, αναστέλλοντας την φωσφορυλίωση της κινάσης, με επακόλουθο το μπλοκάρισμα του μορίου που ενεργοποιεί η κινάση (67).

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως οι πρωτεΐνες 14-3-3 ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω σύνδεσης με το p27, έναν αναστολέα κινάσης εξαρτώμενο από την κυκλίνη. Οι 14-3-3 επιδρούν στο p27, αναστέλλοντας την δράση του στον πυρήνα, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπλέγματος των κυκλινών CDK την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 δεσμεύουν τα φωσφορυλιωμένα στις κυκλίνες και είτε αναστέλλουν τη δράση τους είτε οδηγούν στην τροποποίηση της κινητικής τους από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα. Κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, ο διπλασιασμός του DNA προκαλεί βλάβη στο DNA και, η μετάβαση στη φάση της μίτωσης M προϋποθέτει τη διόρθωση της βλάβης. Η παραμονή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 είναι καταλυτικής σημασίας ώστε να αποφευχθεί η γενομική αστάθεια. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 διατηρούν το κύτταρο στη φάση G2 μέχρι να διορθωθεί το DNA, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου με βλάβη στο DNA. Από τη στιγμή που το κύτταρο εισέλθει στη φάση M τότε, οι πρωτεΐνες 14-3-3 επάγουν την εξέλιξή της, ενεργοποιώντας διαδικασίες κυτταροκίνησης. Επίσης, οι 14-3-3 πρωτεΐνες, ανάλογα με τον προσδέτη τους και ανάλογα με τη φωσφορυλίωσή του, ρυθμίζουν είτε

αναστέλλοντας είτε επάγοντας, τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (68).

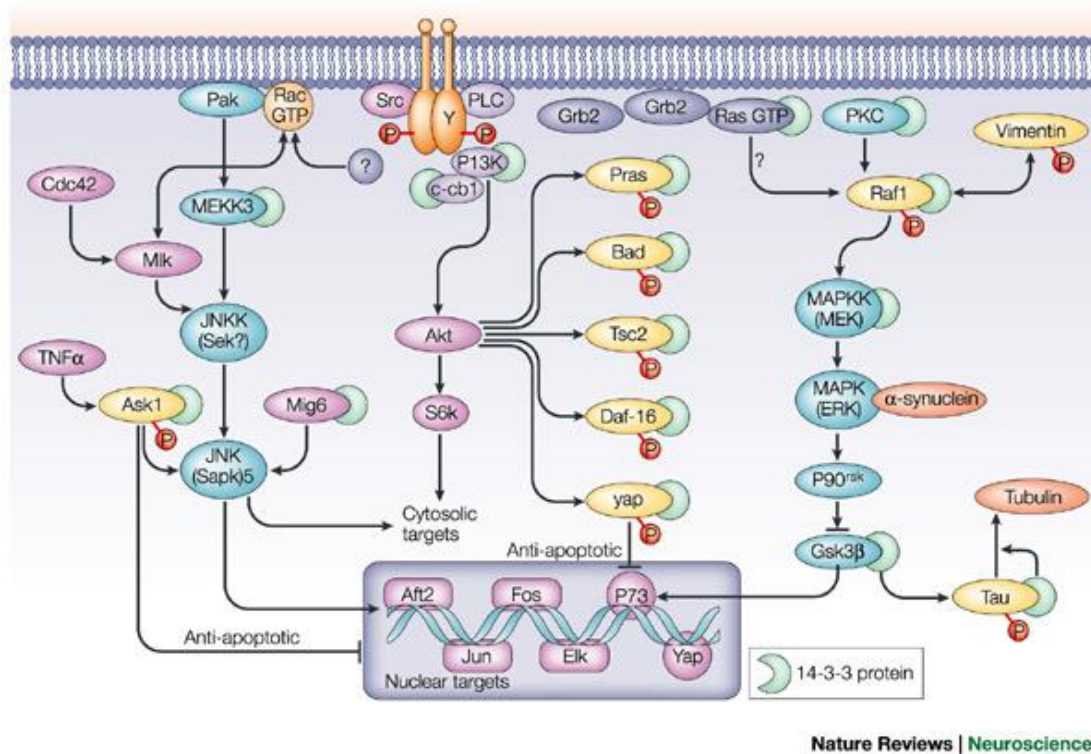
Οι πρωτεΐνες 14-3-3 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με ποικίλους τρόπους, είτε επιδρώντας στην κατανομή των πρωτεϊνών στο κύτταρο, είτε τροποποιώντας την ενζυμική δραστηριότητα. Το Cdc25C αποτελεί μέρος μίας ευρύτερης ομάδας πρωτεϊνικών φωσφατασών που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του συμπλέγματος κινασών CDCK1/cyclinB1, τα οποία με την σειρά τους προάγουν τον κυτταρικό κύκλο από την φάση G2 στην φάση M. Υπερέκφραση του μορίου Cdc25B προκαλεί πρόωρη μίτωση, ακόμα πιο δραστικά από το μόριο Cdc25C. Οι ισομορφές 14-3-3 ε και 14-3-3 γ συνδέονται με το Cdc25C, με αποτέλεσμα την παραμονή του στο κυτταρόπλασμα και την απενεργοποίησή του.

Εκτός από την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, οι πρωτεΐνες 14-3-3 φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο και στον έλεγχο των σημάτων που οδηγούν στην απόπτωση του κυττάρου. Όπως είναι γνωστό, ισορροπία μεταξύ των σημάτων επιβίωσης και σημάτων «θανάτου» είναι καθοριστική για το κύτταρο. Τα σήματα επιβίωσης του κυττάρου αυξάνουν το όριο πάνω από το οποίο τα αποπτωτικά σήματα θα ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Αντίθετα, η μείωση των σημάτων επιβίωσης μειώνει το όριο ενεργοποίησης των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου και αυξάνει την ευαισθησία του κυττάρου στα αποπτωτικά σήματα. Για να κατανοήσουμε τη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου, θα πρέπει να αναγνωρίζουμε τους μοριακούς μηχανισμούς μέσω των οποίων τα σήματα επιβίωσης και τα σήματα απόπτωσης αλληλεπιδρούν. Οι πρωτεΐνες 14-3-3, πιθανά, αντιπροσωπεύουν το κοινό σημείο αλληλεπίδρασης των σημάτων αυτών (69).

Οι πρωτεΐνες 14-3-3 ρυθμίζουν την απόπτωση μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα δύο προαποπτωτικά μόρια Bax και BAD (Bcl-2/BclXL antagonist of cell death). Το BAD όταν δεν είναι φωσφορυλιωμένο κατευθύνεται στο μιτοχόνδριο όπου προκαλεί απόπτωση μέσω δέσμησης και απενεργοποίησης του Bcl-2/BclXL. Όταν το κύτταρο δέχεται σήματα επιβίωσης, οι κινάσες που επάγονται από τα σήματα επιβίωσης ενεργοποιούνται. Κινάσες επιβίωσης είναι οι κινάσες AKT (Protein Kinase B), Pak-1, Pak-5, p7056, Rsk, Pim-1 και άλλες. Η φωσφορυλίωση του BAD σε συγκεκριμένες σερίνες δημιουργεί μοτίβο δέσμησης των πρωτεϊνών 14-3-3. Η επακόλουθη δέσμηση του φωσφορυλιωμένου BAD στις 14-3-3 πρωτεΐνες έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευσή του στο κυτταρόπλασμα και την απενεργοποίησή του. Όταν, όμως, τα σήματα επιβίωσης μειωθούν ή όταν τα σήματα θανάτου αυξηθούν, τα μόρια που επάγονται από το στρες, για παράδειγμα η κινάση JNK (Jun-N-terminal kinase) ή το



σηματοδοτικό μονοπάτι p38/MAPK ενεργοποιούνται. Η κινάση JNK φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες 14-3-3, με αποτέλεσμα, ο προσδέτης τους BAD να απελευθερώνεται και να κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια όπου θα ξεκινήσει τους μηχανισμούς απόπτωσης. Το ίδιο συμβαίνει και με το προαποπτωτικό μόριο Bax (Bcl-2 associated x protein), το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή μορφή (70, 71).



**Εικόνα 13: Ο ρόλος των πρωτεϊνών 14-3-3 στο μονοπάτι των MAP κινασών.** Από βιβλιογραφική αναφορά (72)

Παράλληλα, οι πρωτεΐνες 14-3-3 συμβάλλουν στη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ σημάτων επιβίωσης και θανάτου μέσω της δέσμευσής τους στους μεταγραφικούς παράγοντες FOXO, οι οποίοι ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων που οδηγούν στην απόπτωση. Οι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO εμφανίζουν αλληλουχίες NLS και NES. Η δέσμευση των μεταγραφικών παραγόντων FOXO στις 14-3-3 πρωτεΐνες αφήνει, αρχικά, εκτεθειμένες τις NES αλληλουχίες με αποτέλεσμα τη μετακίνησή τους από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και, στη συνέχεια, επικαλύπτει τις NLS αλληλουχίες με αποτέλεσμα την καθήλωσή τους στο κυτταρόπλασμα (68, 69). Επομένως, η έκθεση του κυττάρου σε σήματα επιβίωσης αναστέλλει την απόπτωση αφού, οι πρωτεΐνες 14-3-3 καθλώνουν στο κυτταρόπλασμα τις φωσφορυλιωμένες



προαποπτωτικές πρωτεΐνες. Η μείωση των σημάτων επιβίωσης επάγει την αποφωσφορυλίωση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή τους από τις 14-3-3 πρωτεΐνες. Οι αποδεσμευμένες πλέον προαποπτωτικές πρωτεΐνες κατευθύνονται στη θέση δράσης τους, όπου ενεργοποιούν τον κυτταρικό θάνατο. Από την άλλη, όταν τα αποπτωτικά σήματα είναι συνεχή, οδηγούν στη φωσφορυλίωση των ίδιων των 14-3-3 πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών από αυτές, ώστε να ξεκινήσει η απόπτωση. Οι πρωτεΐνες 14-3-3, πιθανά, είναι τα μόρια τα οποία αυξάνουν το όριο πάνω από το οποίο τα αποπτωτικά σήματα θα ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου και, έτσι, η αύξηση ή η μείωση των επιπέδων τους τροποποιεί την ισορροπία μεταξύ επιβίωσης και απόπτωσης (69).

### **5.6 Ο ρόλος των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νόσους**

Μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες και ζώα, καθώς και δεδομένα από δείγματα ασθενών δείχνουν μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνών 14-3-3 και διαφόρων τύπων καρκίνου. Οι 14-3-3 φαίνεται να υποστηρίζουν την δράση ογκογονιδίων και να αναστέλλουν την δράση ογκοκατασταλτικών παραγόντων σε κύτταρα από καρκίνο του μαστού. Από την άλλη πλευρά, μία ισομορφή των 14-3-3, η 14-3-3 σ που έχει αποδειχθεί πως δρα σαν ογκοκατασταλτικός παράγοντας, φαίνεται να καταστέλλεται στους ασθενείς με καρκίνο εξαιτίας μεθυλίωσης του γονιδίου της. Ένας μηχανισμός που πιθανότατα εξηγεί την ογκοκατασταλτική δράση της ισομορφής 14-3-3 σ είναι η αλληλεπίδρασή της με μία κινάση κλειδί για την επιβίωση του κυττάρου, την Akt. Στην αντίθετη πλευρά βρίσκονται οι ισομορφές 14-3-3 ζ,β,τ, οι οποίες παρουσιάζονται ως ογκογόνα μόρια. Αυτές οι ισομορφές υπερεκφράζονται σε κυτταρικές καρκινικές σειρές καθώς και σε δείγματα ασθενών με καρκίνο. Επιπλέον, μερικές ισομορφές 14-3-3, με κυριότερη την 14-3-3 ζ, φαίνεται να σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα. Μάλιστα, η συγκεκριμένη ισομορφή έχει προταθεί σαν προγνωστικός δείκτης και θεραπευτικός στόχος στο συγκεκριμένο είδος καρκίνου. Φαίνεται να υπερεκφράζεται σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Παρόλο, όμως, που η συσχέτιση μεταξύ της ισομορφής 14-3-3 ζ και του καρκίνου του πνεύμονα έχει πλήρως διευκρινιστεί, ο ρόλος των υπολοίπων ισομορφών στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου φαίνεται πολύπλοκος (73).

Επιπλέον, ένας σημαντικός αριθμός νευρολογικών παθήσεων έχει συσχετιστεί με διαταραγμένη λειτουργία των πρωτεϊνών 14-3-3. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι ισομορφές 14-3-3 είναι παρούσες στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των ασθενών με σποραδική νόσο Creutzfeldt-Jakob και με ασθένειες που σχετίζονται με τα prions.

Επίσης, υπάρχουν δεδομένα που συσχετίζουν τις 14-3-3 με τη νόσο Parkinson, μέσω της κινάσης LRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase 2). Επίσης, σε μοντέλα ζώων φάνηκε πως πολλαπλές ισομορφές των 14-3-3 συνδέονται με την ασυνουκλεΐνη, το μόριο που είναι κυρίως υπεύθυνο για την νόσο Parkinson. Παράλληλα, έχει προταθεί η άποψη ότι οι 14-3-3 παίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια της νόσου Alzheimer, καθώς οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έχουν βρεθεί στα νευροϊνίδια που συσσωρεύονται.

Τέλος, οι πρωτεΐνες 14-3-3 φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια μίας μεγάλης ποικιλίας ασθενειών, όπως η διαβητική μυοκαρδιοπάθεια, η πολλαπλή σκλήρυνση, η ενδομητρίωση, το γλαύκωμα, οι φωσφολιπιδώσεις, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και διάφορες λοιμώδεις νόσοι. Όμως, μέχρι σήμερα, δεν έχει αποδοθεί ρόλος στην οικογένεια των πρωτεϊνών 14-3-3 στη νεφρική ίνωση και στις νεφροπάθειες γενικότερα. Για το λόγο αυτό, η παρούσα εργασία εστιάζεται στην ανίχνευσή τους σε νεφρικές παθήσεις σε πειραματόζωα και βιοψίες (73).

## ΜΕΡΟΣ Ι: ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

#### ΜΟΝΟΠΛΕΥΡΗ ΑΠΟΦΡΑΞΗ ΟΥΡΗΤΗΡΑ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

##### 6.1 Ζωικά μοντέλα ίνωσης

Οι διαδικασίες ανάπτυξης της ίνωσης έχουν μελετηθεί σε διάφορα μοντέλα, κυρίως τρωκτικών, τα οποία εξετάζουν την πρόκληση ίνωσης σε συγκεκριμένα όργανα υπό την επιρροή διαφορετικών παραγόντων. Πολύ γνωστά είναι τα μοντέλα της ενδοτραχειακής χορήγησης μπλεομυκίνης στον πνεύμονα, της απάλειψης του γονιδίου της δεσμίνης στη διατακική μυοκαρδιοπάθεια και της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα στη νεφρική ίνωση (74). Στις περιπτώσεις αυτές, η ίνωση των διαφόρων οργάνων παρουσιάζει όμοια αλλά και διαφορετικά χαρακτηριστικά, που μπορεί να αντανakλούν τις διαφορές στη λειτουργία και το χαρακτήρα κάθε οργάνου, την ξεχωριστή επίδραση κάθε παράγοντα ερεθισμού, καθώς και την πολυπλοκότητα του φαινομένου. Για παράδειγμα, η ίνωση του πνεύμονα στο μοντέλο της μπλεομυκίνης αναπτύσσεται σε σύντομο χρονικό διάστημα και χαρακτηρίζεται από την εισροή μεγάλου αριθμού φλεγμονωδών κυττάρων και ινοβλαστών στον πνεύμονα, ενώ η απώλεια των καρδιακών κυττάρων καθώς και η ανάπτυξη φλεγμονής και ίνωσης στη διατακική μυοκαρδιοπάθεια παρατηρούνται σε μεγάλο χρονικό διάστημα.

##### **Μοντέλα νεφρικής ίνωσης: η μονόπλευρη απόφραξη ουρητήρα σε τρωκτικά**

Στην περίπτωση του νεφρού, η ίνωση που αναπτύσσεται στο διάμεσο χώρο μεταξύ των νεφρικών σωληναρίων (tubulointerstitial fibrosis) είναι το τελικό αποτέλεσμα πολλών νεφρικών ασθενειών και οδηγεί σε προοδευτική απώλεια της νεφρικής λειτουργίας. Για τη μελέτη της νεφρικής ίνωσης έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα ζωικά μοντέλα, όπως τρωκτικά μετά από χορήγηση θειαζιδίων και άλλων χημικών παραγόντων (αδριαμυκίνη, πουρομυκίνη) ή αντισωμάτων που στοχεύουν τη βασική μεμβράνη των νεφρικών σωληναρίων ή των σπειραμάτων, διαγονιδιακοί ποντικοί που υπερεκφράζουν τον παράγοντα TGF-β1 σε συγκεκριμένο τμήμα του νεφρού, διαγονιδιακά ζώα που υπερεκφράζουν τα γονίδια ρενίνης ή αγγειοτενσίνης, καθώς και μοντέλα αποφρακτικής νεφροπάθειας (6).

Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο νεφρικής ίνωσης αποτελεί εκείνο της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα σε τρωκτικά (Unilateral Ureteral Obstruction model) που χαρακτηρίζεται από οξεία και πλήρη απόφραξη του ουρητηρικού

αγωγού, οδηγώντας σε εκφυλισμό των νεφρικών σωληναρίων και ανάπτυξη ίνωσης. Η κατάσταση αυτή συναντάται σπάνια στους ανθρώπους (π.χ. σε νεογνά με συγγενείς ανωμαλίες του ουρικού σωλήνα και σε άνδρες με ασθένεια του αδένου του προστάτη), αλλά έχει το πλεονέκτημα ότι μιμείται σε σύντομο χρονικό διάστημα τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης της νεφρικής ίνωσης και για το λόγο αυτό αποτελεί πλέον ένα από τα καθιερωμένα μοντέλα μελέτης. Οι πρώτες μελέτες σε μοντέλο UUO έγιναν σε κουνέλια και σε σκύλους, όμως οι πρόσφατες μελέτες γίνονται σε τρωκτικά (αρουραίο και ποντίκι). Το μοντέλο UUO είναι πλήρες όταν ο ουρητήρας απολινώνεται ολικώς, ενώ είναι μερικό όταν ο ουρητήρας απολινώνεται μερικώς. Η μερική απολίνωση γίνεται, συνήθως, για να μελετηθεί η παθογένεια της συγγενούς κυστεοουρητηρικής παλινδρόμησης (75).

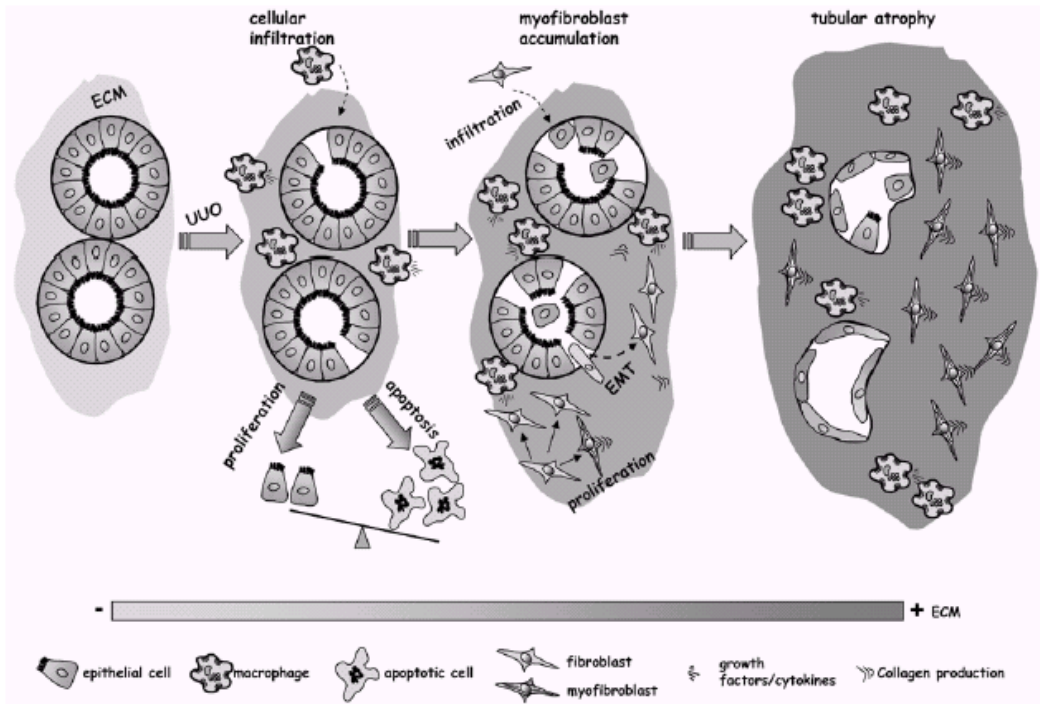
Στο πλήρες UUO, μια γρήγορη ακολουθία γεγονότων στον αποφραγμένο νεφρό οδηγεί, μέσα σε 24 ώρες, στο μηδενισμό του σπειραματικού ρυθμού διήθησης. Μέσα σε λίγες ημέρες, παρατηρείται υδρονέφρωση. Ο σωληναριοδιάμεσος χώρος διηθείται από φλεγμονώδη κύτταρα, τα μακροφάγα εκκρίνουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, παρατηρείται διαταραχή της ισορροπίας ανάπτυξη-απόπτωση υπέρ της απόπτωσης των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων, οι ινοβλάστες ενεργοποιούνται και οι μυοϊνοβλάστες παράγουν ECM, η οποία συσσωρεύεται. Αφού το ερέθισμα της απόφραξης παραμένει, η συσσώρευση της ECM οδηγεί σε αύξηση του διάμεσου χώρου και η ανεξέλεγκτη απόπτωση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων οδηγεί σε ατροφία των σωληναρίων (εικόνα 14). Η εκσεσημασμένη απώλεια του νεφρικού παρεγχύματος παρατηρείται στη μία με δύο εβδομάδες (75).

Τα πλεονεκτήματα της χρησιμοποίησης του μοντέλου UUO για τη μελέτη της νεφρικής ίνωσης είναι πολλά. Είναι ένα εύκολο επαναλήψιμο ζωικό μοντέλο, κυρίως στα τρωκτικά. Δε χορηγείται τοξική ουσία και δεν εκτίθεται το ζώο σε ουραιμικό περιβάλλον, αφού ο άλλος νεφρός λειτουργεί κανονικά και αντισταθμίζει την έκπτωση λειτουργίας του απολινωμένου. Μερικοί συγγραφείς πιστεύουν ότι ο μη απολινωμένος νεφρός μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως νεφρός ομάδας ελέγχου, αλλά νεώτερα δεδομένα (αδημοσίευτα από την ομάδα του εργαστηρίου μας) υποστηρίζουν ότι αυτό δεν ισχύει (75). Το μοντέλο αυτό επιτρέπει τη δημιουργία διαφορετικής διάρκειας και διαφορετικού βαθμού απόφραξης, ακόμα και τη λύση της απόφραξης ώστε να μελετηθεί η περίοδος «ανάκαμψης» (recovery). Το μοντέλο της ετερόπλευρης απόφραξης ουρητήρα με νεφρεκτομή στον άλλο νεφρό επιτρέπει τη μέτρηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, τη μέτρηση ουρίας και κρεατινίνης και, την αξιολόγηση της πρωτεϊνουρίας του ζώου. Το μοντέλο UUO μπορεί να εφαρμοστεί και σε γενετικά τροποποιημένα ζώα (75).

Υπάρχουν κάποια θέματα τα οποία θα πρέπει να ληφθούν υπόψη όταν χρησιμοποιείται το μοντέλο UUO στη μελέτη της νεφρικής ίνωσης. Η μελέτη της νεφρικής ίνωσης στο μοντέλο αυτό πρέπει να γίνει σε πολλαπλούς χρόνους. Πιθανά, τα ευρήματα που θα παρουσιαστούν στο νεφρό κατά την πρώτη βδομάδα απολίνωσης του ουρητήρα, θα εξαφανιστούν ή θα μειωθούν στη συνέχεια. Είναι πολύ σημαντικό για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, το ότι υπάρχουν πολλές περιπτώσεις UUO στις οποίες παρατηρήθηκαν θεαματικές αλλαγές την 7η ημέρα και οι αλλαγές αυτές δεν παρατηρούνταν αργότερα ή υπάρχουν περιπτώσεις όπου δεν υπήρχαν θεαματικές αλλαγές την 7η ημέρα αλλά τροποποιούνταν τη 14η ή την 21η (76). Επίσης, όταν χρησιμοποιείται ο νεφρός που δεν απολινώθηκε ως νεφρός της ομάδας ελέγχου θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι κυτταρικές, οι μεταβολικές και οι λειτουργικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν ως απάντηση στην ετερόπλευρη απόφραξη (75).

Μειονεκτήματα της χρησιμοποίησης του μοντέλου UUO είναι ότι το ζώο πρέπει να επιβιώσει του χειρουργείου, η μέθοδος πρόκλησης νεφρικής ίνωσης είναι επιθετική, η αντιρόπηση της έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας από τον αντίθετο νεφρό αποκλείει τη δυνατότητα αξιολόγησης δεικτών νεφρικής λειτουργίας (για παράδειγμα μέτρηση ουρίας και κρεατινίνης ορού) και, δεν μπορεί να γίνει εύκολα συλλογή ούρων από τον απολινωμένο νεφρό. Λόγω της μειωμένης νεφρικής αιματικής ροής που προκαλεί η ετερόπλευρη απόφραξη του ουρητήρα, πειράματα βάσει χρήσης θεραπευτικών σκευασμάτων θα πρέπει να αξιολογήσουν τους διαφορετικούς νεφρικούς ρυθμούς κατανομής (76).

Τα διαφορετικά χαρακτηριστικά της ινωτικής παθολογίας αναπτύσσονται όλα μέσα σε μια εβδομάδα από την άσκηση της απόφραξης και εμφανίζουν υψηλή αναπαραγωγισιμότητα από το ένα πείραμα στο άλλο. Αυτά περιλαμβάνουν την εισροή κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο νεφρικό διάμεσο χώρο (tubulointerstitium), τον αυξημένο πολλαπλασιασμό αλλά και απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων με τελικό αποτέλεσμα τον εκφυλισμό τους, τη συσσώρευση μυοϊνοβλαστών και την ανεξέλεγκτη εναπόθεση εξωκυττάρου στρώματος (77).



**Εικόνα 14. Περίληψη των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης της αποφρακτικής νεφροπάθειας.** Η πειραματική ουρητηρική απόφραξη επάγει τη διείσδυση μακροφάγων στο διάμεσο χώρο των νεφρικών σωληναρίων. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που από τη μια πλευρά ευνοούν την απόπτωση και ατροφία των νεφρικών κυττάρων, και από την άλλη επάγουν την ενεργοποίηση των ινοβλαστών. Οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες παράγουν εξωκυττάριο στρώμα που σταδιακά συσσωρεύεται οδηγώντας στην ανάπτυξη ίνωσης. Από τη βιβλιογραφική αναφορά (75).

Λίγες ώρες μετά την ουρητηρική απόφραξη παρατηρείται διείσδυση και συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στο διάμεσο χώρο μεταξύ των νεφρικών σωληναρίων. Τα κύτταρα αυτά, που περιλαμβάνουν κυρίως μακροφάγα, προέρχονται από τα τοπικά αιμοφόρα αγγεία και εισέρχονται στο νεφρικό διάμεσο χώρο δημιουργώντας επαφές μεταξύ υποδοχέων της επιφανείας τους και μορίων προσκόλλησης που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων. Δεδομένα που αποκτήθηκαν από τη δημιουργία ποντικών με απάλειψη κάποιων από αυτά τα μόρια (knockout ποντίκια) έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών osteopontin και CD44 καθώς και εκείνη μεταξύ των μορίων sulfatide και L-selectin, που βρίσκονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μακροφάγων αντίστοιχα, είναι απαραίτητες για τη μετανάστευση των μακροφάγων στο νεφρικό ιστό στο μοντέλο UO. Ακόμα, άλλα σημαντικά μόρια προσκόλλησης και κυτοκίνες,

συμπεριλαμβανομένων των ICAM-1, VCAM-1 και MCP-1, συνεισφέρουν στη στρατολόγηση των μακροφάγων και των άλλων λευκοκυττάρων στο μοντέλο UUO (78).

Τα στρατολογούμενα μακροφάγα εκκρίνουν κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που επάγουν μια ανισορροπία ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των νεφρικών κυττάρων, οδηγώντας στην προοδευτική κυτταρική ατροφία και απώλεια των νεφρικών σωληναρίων. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ρυθμίζεται θετικά από τις κυκλίνες (cyclins) και τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (cyclin-dependent kinases), και αρνητικά από αναστολείς του κυτταρικού κύκλου που απενεργοποιούν τα σύμπλοκα κυκλινών-κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitors). Κάποιοι από αυτούς τους αναστολείς, όπως οι p21 και p27 που ανήκουν στην οικογένεια των αναστολέων CIP/KIP, έχει δείχθει πως συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο νεφρικό ιστό μετά την επαγωγή ίνωσης με ουρητηρική απόφραξη. Απάλειψη των γονιδίων p21 και p27 με τη δημιουργία knock-out ποντικών είχε σαν αποτέλεσμα τον υψηλότερο πολλαπλασιασμό των μυοϊνοβλαστών και των επιθηλιακών νεφρικών κυττάρων αντίστοιχα, χωρίς όμως να επηρεάσει την ανάπτυξη της επαγόμενης ίνωσης. Μια άλλη πρωτεΐνη που επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό επάγοντας την αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή την απόπτωση είναι ο μεταγραφικός παράγοντας p53. Knock-out ποντίκια για τον παράγοντα p53 παρουσίασαν λιγότερη κυτταρική απόπτωση μετά την επαγωγή ίνωσης στο μοντέλο UUO. Ωστόσο, το γεγονός ότι η απάλειψη συγκεκριμένων παραγόντων ελέγχου του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης δεν επηρέασε ολοκληρωτικά τις συγκεκριμένες διεργασίες υποδεικνύει ότι ένας μεγάλος αριθμός μεσολαβητών με πιθανόν λειτουργική συμπληρωματικότητα και χρονικά ή τοπικά περιορισμένη δράση εμπλέκεται στη ρύθμισή τους.

Εκτός από τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των νεφρικών κυττάρων, οι εκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες πυροδοτούν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των μυοϊνοβλαστών, ένα σημαντικό γνώρισμα του νεφρικού ιστού μετά την επαγωγή της ουρητηρικής απόφραξης. Οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες παράγουν παθολογικά αυξημένη ποσότητα εξωκυττάρου στρώματος, γεγονός που εγκαθιστά μια ανισορροπία ανάμεσα στη σύνθεση και την αποικοδόμησή του οδηγώντας στην ανάπτυξη ίνωσης. Η αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας πιστεύεται πως εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου που ενεργοποιεί με τη σειρά του τις μεταλλοπρωτεάσες του στρώματος (MMPs). Ο κύριος αναστολέας των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου, η πρωτεΐνη PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), βρίσκεται αυξημένη σε όλες

σχεδόν τις νεφρικές ασθένειες συμπεριλαμβανομένων των αποφρακτικών παθήσεων του νεφρού. Η εφαρμογή ουρητηρικής απόφραξης σε knock-out ποντίκια για τον παράγοντα PAI-1 οδήγησε στην ανάπτυξη ίνωσης σε σημαντικά χαμηλότερο βαθμό σε σχέση με τα control ποντίκια, συνοδευόμενη από μείωση στον αριθμό των μυοϊνοβλαστών. Ωστόσο, στα knock-out ποντίκια δεν παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργοποίηση του συστήματος του πλασμινογόνου, αλλά σημαντική μείωση στον αριθμό των ενεργοποιημένων μακροφάγων, γεγονός που υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο του παράγοντα PAI-1 στη φλεγμονώδη αντίδραση.

Ένα άλλο σύστημα που προάγει την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας στις νεφρικές ασθένειες είναι το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης, γνωστό με τη συντομογραφία RAS (Renin Angiotensin System). Στο σύστημα αυτό, η αγγειοτενσίνη II είναι ο κύριος προ-ινωτικός παράγοντας που παράγεται από το πρόδρομο αγγειοτενσινογόνο μέσω της δράσης της ρενίνης και του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης I σε II (Angiotensin Converting Enzyme). Η αγγειοτενσίνη II συνδέεται σε διαμεμβρανικούς κυτταρικούς υποδοχείς ενεργοποιώντας ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και την παραγωγή μεγάλου αριθμού προ-φλεγμονοδών και προ-ινωτικών κυτοκινών, όπως τα μόρια TNFα και TGFβ. Η δράση της αγγειοτενσίνης II στο μοντέλο UUO εξισορροπείται από την παραγωγή της βραδυκινίνης μέσω του συστήματος κινίνης-καλλικρεΐνης. Η βραδυκινίνη προσδένεται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς οδηγώντας στην ενδοκυτταρική ενεργοποίηση του συστήματος του πλασμινογόνου, την παραγωγή των μεταλλοπρωτεασών του στρώματος και την επακόλουθη αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. Παρά τις ουσιώδεις γνώσεις που έχουν αποκτηθεί μέχρι σήμερα πάνω στη ρύθμιση της παραγωγής του εξωκυττάριας στρώματος, περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες για τη διαλεύκανση της αλληλεπίδρασης των συστημάτων που περιγράφηκαν και την καλύτερη κατανόηση των ιδιοτήτων και του ρόλου τους στις ινωτικές ασθένειες.

Ένα τελευταίο μόριο-κλειδί της ινωτικής διαδικασίας, ο ρόλος του οποίου έχει μελετηθεί και στο μοντέλο της ουρητηρικής απόφραξης, είναι ο παράγοντας TGF-β. Όπως περιγράφηκε αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα, ο TGF-β αποτελεί το μόνο γνωστό παράγοντα ικανό να επάγει όλα τα στάδια της ινωτικής διαδικασίας, ενώ οι δράσεις του σχετίζονται με μείωση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεασών του στρώματος, αύξηση των αναστολέων TIMP (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases) και PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), καθώς και αυξημένη παραγωγή πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας. Η εφαρμογή ουρητηρικής απόφραξης σε knock-out ποντίκια για συστατικά του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β υπέδειξε



το σημαντικό ρόλο του στην επαγωγή της ίνωσης. Ακόμα, δεδομένα από knockout ποντίκια αποκάλυψαν πως η παραγωγή ενεργού παράγοντα TGF- $\beta$  ελέγχεται από τις ιντεγκρίνες (διαμεμβρανικοί κυτταρικοί υποδοχείς για συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας) και το σύστημα του πλασμινογόνου (75).

## ΜΕΡΟΣ II: ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος αποτελεί μια προοδευτικά επιδεινούμενη πάθηση, η οποία υπολογίζεται ότι αφορά στο 10-13% του πληθυσμού παγκοσμίως. Στο τελικό της στάδιο η μοναδική θεραπεία που μπορεί να εξασφαλίσει την επιβίωση του ασθενούς είναι η εξωνεφρική κάθαρση ή αιμοκάθαρση ή η μεταμόσχευση νεφρού. Τα αίτια της είναι πολυάριθμα και σχετίζονται με μεγάλο αριθμό παθήσεων, οργανικών ή συστηματικών.

Η νεφρική ίνωση αποτελεί την βασική ιστολογική εικόνα των σοβαρότερων παθήσεων του νεφρού. Μπορεί να επισυμβεί τόσο στο σπείραμα όσο και στον διαμεσοσωληναριακό χώρο, οδηγώντας σε αντίστοιχη δυσλειτουργία της περιοχής. Τα αίτια της είναι ποικίλα: συγγενείς ανωμαλίες (πολυκυστική νόσος), παθήσεις του σπειράματος (σπειραματονεφρίτιδες), δευτεροπαθείς στα πλαίσια συστηματικών ασθενειών (σακχαρώδης διαβήτης, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, αγγειίτιδες), διαμεσοσωληναριακές παθήσεις και τέλος βλάβες που οδηγούν σε απόφραξη της ουρητηρικής οδού. Παρά τον μεγάλο αριθμό παθήσεων που οδηγούν σε ίνωση, το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα, η χρόνια νεφρική νόσος που τελικά οδηγεί σε ανεπάρκεια του οργάνου. Γι' αυτό το λόγο, κρίνεται αναγκαία η μελέτη και ανακάλυψη νέων βιοδεικτών που θα αναγνωρίζουν την νεφρική ίνωση και κατ'επέκταση την χρόνια νεφρική νόσο σε πρώιμο στάδιο, καθώς έχει φανεί πως η τροποποίηση ή εξάλειψη του παράγοντα που την προκαλεί σε αρχικό στάδιο μπορεί να αναστρέψει την πορεία της νόσου.

Πρωτεωμικές μελέτες των Prakoura N et al. και Kyrgiou KP et al. στο πειραματικό μοντέλο της μονόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης έχουν δείξει ότι από τα αρχικά στάδια ανάπτυξης της νεφρικής ίνωσης υπάρχει υπερέκφραση της πρωτεΐνης καλρετικουλίνης (79). Επιπλέον, πρωτεωμική ανάλυση κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν καλρετικουλίνη έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών. Ενδεδειγμένες μελέτες της οικογένειας αυτής σε νεφρικές παθήσεις (σπειραματοπάθειες) από ανθρώπινο υλικό δεν έχουν πραγματοποιηθεί.

**Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών σε βιοψίες ασθενών με σπειραματοπάθειες (IgA νεφροπάθεια, μεμβρανώδη νεφροπάθεια, νεφρίτιδα του συστηματικού ερυθηματώδη λύκου και νεφροπάθεια σχετιζόμενη με ANCA αγγειίτιδες) και ο συσχετισμός των ευρημάτων με τα κλινικά δεδομένα από το ιστορικό αυτών των ασθενών.**

Πιστεύεται ότι η προτεινόμενη ερευνητική προσέγγιση θα οδηγήσει σε σημαντικά ευρήματα σχετικά με τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν η καλρετικουλίνη και οι 14-3-3 σαν πρώιμοι δείκτες βλάβης του νεφρικού παρεγχύματος και ειδικότερα του σωληναριακού διαμερίσματος.

## ΜΕΡΟΣ II: ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1 Ζωικά μοντέλα νεφρική ίνωσης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό ζωικό μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη ουρητήρα (Unilateral Ureteral Obstruction, UUO). Το μοντέλο UUO έγινε συνολικά σε 9 ποντίκια, τα οποία χωρίστηκαν σε 3 ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελούσε την ομάδα των χειρουργημένων ζώων της ομάδας ελέγχου, η δεύτερη την ομάδα των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για δύο (2) ημέρες και, η τρίτη αποτελούσε την ομάδα των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για οκτώ (8) ημέρες.

Το μοντέλο UUO διενεργήθηκε βάσει της βιβλιογραφικής αναφοράς [49] σε συνολικά σε 9 ενήλικα ποντίκια C57BL/6, 20-30 g το κάθε ένα. Τα ποντίκια προμηθεύτηκαν από τη Μονάδα Ζώων του Πειραματικού Χειρουργείου του Ιδρύματος, παρέμειναν στη φυσιολογική τους διαίτα και, η πρόσληψη ύδατος ήταν ελεύθερη.

Κατά τη διάρκεια της διενέργειας του UUO, τα ζώα παρέμεναν σε κλωβούς με τεχνητό φωτισμό δωδεκάωρης εναλλαγής φωτός και σκότους και, βρίσκονταν υπό τη συνεχή παρακολούθηση του προσωπικού του Τμήματος Ζώων. Η χειρουργική επέμβαση έγινε υπό άσηπτες συνθήκες, από ειδικά εκπαιδευμένο κτηνίατρο στο Πειραματικό Χειρουργείο του Ιδρύματος. Τα τρία ποντίκια αποτελούσαν την ομάδα των χειρουργημένων ζώων της ομάδας ελέγχου, τα άλλα τρία αποτελούσαν την ομάδα των χειρουργημένων ζώων των δύο (2) ημερών και, τα τελευταία τρία αποτελούσαν την ομάδα των χειρουργημένων ζώων των οκτώ (8) ημερών. Η αναισθησία όλων των ζώων έγινε με χορήγηση εισπνεόμενου ισοφλουορένιου. Η πρόσβαση στο δεξιό ουροποιητικό σύστημα των ζώων έγινε με μέση κοιλιακή τομή. Ο δεξιός ουρητήρας των ζώων της ομάδας ελέγχου παρασκευάστηκε και αφέθηκε ελεύθερος. Στα ζώα της ομάδας των δύο και οκτώ ημερών, έγινε παρασκευή του δεξιού ουρητήρα και ακολούθησε απολίνωσή του με ράμμα από μετάξι σε απόσταση 1 cm από τη νεφρική πύελο. Ακολούθησε ράψιμο της μέσης κοιλιακής τομής και, μετά την ανάνηψή τους, τα ζώα τοποθετήθηκαν στους κλωβούς τους. Τη δεύτερη μετεγχειρητική ημέρα θυσιάστηκαν τα ζώα της ομάδας ελέγχου και τα ζώα της ομάδας των δύο ημερών. Την όγδοη μετεγχειρητική ημέρα, θυσιάστηκαν τα ζώα της ομάδας των οκτώ ημερών. Της θυσίας προηγήθηκε αναισθησία με ισοφλουορένιο. Και οι δύο νεφροί από το κάθε ζώο συλλέχτηκαν και, αφού ξεπλύθηκαν με φυσιολογικό ορό, τεμαχίστηκαν σε πέντε τεμάχια ο κάθε ένας οπότε, διατηρήθηκαν

είτε σε 10% φορμαλδεΐδη, είτε σε υγρό άζωτο είτε εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Τα τεμάχια που εγκλείστηκαν σε παραφίνη έγιναν τομές των 5 μm στο τμήμα ιστοχημείας του Ιδρύματος.

## **2.2 Ανοσοϊστοχημεία νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε ποντίκι**

Η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημεία στις νεφρικές τομές που εγκλείστηκαν στην παραφίνη, με την τεχνική χρώσης με ανοσοϋπεροξειδάση. Τα πειράματα έγιναν επί τρεις φορές. Για την ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιήθηκε για πρωτογενές αντίσωμα το pan 14-3-3 (K19): sc-629 της Santa Cruz Biotechnology.

Αρχικά, από τις τομές αφαιρέθηκε η παραφίνη. Στη συνέχεια, η πλειοψηφία της διαδικασίας έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα. Τα πλακάκια με τις ιστοικές τομές ενυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε xylene για 15 λεπτά επί 2 φορές, σε 100% ethanol για 5 λεπτά επί 2 φορές, σε 90% ethanol για 5 λεπτά, σε 75% ethanol για 5 λεπτά, σε διπλά απιονισμένο νερό για 5 λεπτά και, τελικά, σε PBS για 5 λεπτά. Ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> κατά την οποία τα πλακάκια εμβαπτίστηκαν για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου σε 50 ml methanol με 2.5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% ώστε να κατασταλεί η ενδογενής δραστικότητα της υπεροξειδάσης. Τα πλακάκια ξεπλύθηκαν σε PBS για 15 λεπτά επί 2 φορές. Ακολούθησε η διαδικασία αποκάλυψης αντιγόνων με κιτρικό κατά την οποία, τα πλακάκια θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων για 10 λεπτά, εμβαπτισμένα σε κιτρικό οξύ 10 mM, pH 6. Τα πλακάκια αφέθηκαν να κρυώσουν για 30 λεπτά και, ξεπλύθηκαν 2 φορές σε PBS για 10 λεπτά. Ακολούθησε αναστολή των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων της κάθε ιστοικής τομής (blocking) για 2 ώρες με 50 μl από 10% βόειο εμβρυικό ορό (FBS) και 0.1% Triton. Στη συνέχεια, οι τομές επώαστηκαν η κάθε μία με 45 μl πρωτογενούς αντισώματος (primary antibody) σε αραιώση 1/500 για τη διάρκεια της νύκτας, σε υγρό σκοτεινό θάλαμο στους 4°C. Στις τομές που χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο, σαν πρωτογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκαν 45 μl IgG από κουνέλι, σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml ενώ, στις υπόλοιπες τομές τοποθετήθηκαν 45 μl από το αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών. Την επόμενη μέρα, τα πλακάκια ξεπλύθηκαν σε PBS για 10 λεπτά επί 2 φορές και, στη συνέχεια, οι τομές επώαστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody) με 50 μl αραιώσης 1/500 η κάθε τομή για 50 λεπτά, σε υγρό θάλαμο, σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα ήταν αντίσωμα κατά IgG συζευγμένο με ιχνηθέτη το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανιού (Horse Radish Peroxide) από κουνέλι. Στη συνέχεια, τα πλακάκια

ξεπλύθηκαν με PBS για 10 λεπτά υπό ελαφρά ανάδευση. Ακολούθησε επώαση της κάθε τομής με 50 µl διαλύματος 3',3'-Diaminobenzidine (DAB) (Vectror Laboratories) για 3-5 λεπτά. Το διάλυμα DAB αποτελείται από 2,5 ml διπλά απιονισμένο νερό, 2 σταγόνες DAB, 1 σταγόνα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και μία σταγόνα ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.5. Η αντίδραση σταμάτησε με εμβάπτιση σε διπλά απιονισμένο νερό και, στη συνέχεια τα πλακάκια εμβάπτιστηκαν σε φιλτραρισμένη αιματοξυλίνη. Ακολούθησε ξέπλυμα με διπλά απιονισμένο νερό και, στη συνέχεια, αφυδάτωση των ιστών. Τα πλακάκια για την αφυδάτωση εμβάπτιστηκαν σε 75% ethanol για 3 λεπτά, σε 90% ethanol για 3 λεπτά, σε 100% ethanol για 3 λεπτά επί 2 φορές και σε xylene για 3 λεπτά επί 2 φορές. Τοποθετήθηκαν 2 σταγόνες διαλύματος DPX, ως βάση (mounting), στο κάθε πλακάκι και στην κορυφή καλυπτήριδα και, αφέθηκαν να στεγνώσουν στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα.

### **2.3 Ανοσοϊστοχημεία νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε βιοψίες ανθρώπινου νεφρικού ιστού**

Η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 3 επαναλήφθηκε σε τομές από βιοψίες νεφρού ασθενών που ελήφθησαν από το αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογοανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η ομάδα των ασθενών που υπεβλήθησαν σε βιοψία λόγω κακοήθειας νεφρού, και από την οποία ελήφθησαν τμήματα των βιοψιών με υγιή ιστό, όπου και μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3. Οι υπόλοιπες βιοψίες στις οποίες μελετήθηκε η συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών αφορούν τις εξής σπειραματοπάθειες: IgA νεφροπάθεια, μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα, νεφρίτιδα του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου και σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας. Οι τομές επώαστηκαν με αντίσωμα 14-3-3 σε αραιώση 1/4000.

### **2.4 Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων ανοσοϊστοχημείας νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε βιοψίες ανθρώπινου νεφρικού ιστού**

Για κάθε ασθενή ελήφθησαν πέντε ανεξάρτητες φωτογραφίες από όλο το μήκος της τομής. Η ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος της ανοσοϊστοχημείας έγινε με το λογισμικό ImageJ της Fiji. Οι ψηφιακές εικόνες της ανοσοϊστοχημείας φορτώθηκαν ξεχωριστά η κάθε μία στο πρόγραμμα και στη συνέχεια διαχωρίστηκαν τα τρία

κανάλια χρωμάτων DAB, αιματοξυλίνη και background (colour deconvolution). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε στο κανάλι DAB. Η θετική χρώση ορίστηκε βάσει καθορισμού ενός εύρους έντασης χρώματος (colour threshold). Το εύρος αυτό, διατηρήθηκε ίδιο σε όλα τα δείγματα των ασθενών. Τέλος, μετρήθηκε η περιοχή θετικής χρώσης (area) σε κάθε φωτογραφία και υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε ασθενή.

## **2.5 Ανοσοφθορισμός νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε ποντίκι**

Αρχικά, από τις τομές αφαιρέθηκε η παραφίνη. Στη συνέχεια, η πλειοψηφία της διαδικασίας έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα. Τα πλακάκια με τις ιστοικές τομές ενυδατώθηκαν με εμβάπτιση σε xylene για 15 λεπτά επί 2 φορές, σε 100% ethanol για 3 λεπτά επί 2 φορές, σε 90% ethanol για 3 λεπτά, σε 75% ethanol για 3 λεπτά και, τελικά, σε PBS για 3 λεπτά. Ακολούθησε η διαδικασία αποκάλυψης αντιγόνων με κιτρικό, κατά την οποία, τα πλακάκια τοποθετήθηκαν σε λουτρό 10mM κιτρικού οξέος pH 6, στους 80°C, για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, τα πλακάκια ξεπλύθηκαν σε PBS για 10 λεπτά επί 3 φορές. Ακολούθησε αναστολή των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων της κάθε ιστοικής τομής (blocking) για 1.5 ώρα, με 50 µl από 5% ορό NDS σε PBS-0.1%Triton σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τομές επωάστηκαν η κάθε μία με 40 µl πρωτογενούς αντισώματος για τη διάρκεια της νύχτας, σε υγρό σκοτεινό θάλαμο στους 4°C. Στις τομές που χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο, αντί για πρωτογενές αντίσωμα ετέθησαν 40 µl PBS ενώ στις υπόλοιπες τομές ετέθησαν 40 µl από το αντίσωμα κατά των πρωτεϊνών 14-3-3 και αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης καλρετικουλίνης, και τα δύο σε αραιώση 1/100. Την επόμενη ημέρα, τα πλακάκια ξεπλύθηκαν σε PBS για 10 λεπτά επί 2 φορές και, στη συνέχεια, οι τομές επωάστηκαν με δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δευτερογενή αντισώματα ήταν το αντίσωμα κατά IgG κουνελιού (antirabbit) συζευγμένο με κόκκινη χρωστική 568 Alexa Fluor και το αντίσωμα κατά IgG όρνιθας 488 Alexa Fluor, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν υπό αραιώση 1/500. Μετά από δύο ξεπλύματα υπό ελαφρά ανάδευση σε PBS για 10 λεπτά η κάθε μία, ακολούθησε επώαση των τομών με 50 µl 4'6-diamidino-2 phenylindole (DAPI) 1/2000 σε PBS στην κάθε μία, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πλακάκια ξεπλύθηκαν ξανά υπό ελαφρά ανάδευση σε PBS για 10 λεπτά επί 2 φορές και, τελικά, στις τομές ετέθη βάση Mowiol (mounting) και καλυπτρίδα και, αφέθηκαν να στεγνώσουν στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής αέρα στο σκοτάδι.

## **2.6 Ανοσοφθορισμός νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε βιοψίες ανθρώπινου νεφρικού ιστού**

Η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 5 επαναλήφθηκε στις τομές από βιοψίες νεφρού ασθενών που ελήφθησαν από το αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογοανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Όπως και για την ανοσοϊστοχημεία, έτσι και για τον ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου η ομάδα των ασθενών που υπεβλήθησαν σε βιοψία λόγω κακοήθειας νεφρού, και από την οποία ελήφθησαν τμήματα των βιοψιών με υγιή ιστό, όπου και μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 και της καλρετικουλίνης. Οι υπόλοιπες βιοψίες στις οποίες μελετήθηκε η συγκεκριμένες πρωτεΐνες αφορούν τις εξής σπειραματοπάθειες: IgA νεφροπάθεια, μεμβρανώδης πειραματονεφρίτιδα, νεφρίτιδα του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου και σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας.

## **2.7 Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων ανοσοφθορισμού νεφρικού ιστού για τις πρωτεΐνες 14-3-3 σε ποντίκι**

Σε κάθε τομή ελήφθησαν τρεις ανεξάρτητες φωτογραφίες από όλο το μήκος της. Η ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος ανοσοφθορισμού έγινε με το λογισμικό ImageJ της Fiji. Οι ψηφιακές εικόνες του ανοσοφθορισμού φορτώθηκαν ξεχωριστά η κάθε μία στο πρόγραμμα και για κάθε ένα από τα κανάλια χρωμάτων μετρήθηκαν η περιοχή (area) και η συνολική πυκνότητα χρώματος (integrated density). Επιπλέον σε κάθε φωτογραφία μετρήθηκε και το background. Τέλος υπολογίστηκε ο διορθωμένος φθορισμός κυττάρων (corrected total cell fluorescence, CTCF) από τον τύπο:  $CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Area} \times \text{Mean fluorescence of background})$  και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων σε κάθε κανάλι χρώματος.

## **2.8 Κλινικά δεδομένα**

Παράλληλα με τις τομές των βιοψιών, ελήφθησαν από το αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και τα ιατρικά δεδομένα των ασθενών, όπως είχαν καταγραφεί από τους θεράποντες ιατρούς και τους Παθολογοανατόμους που εξέτασαν το υλικό. Τα ιατρικά δεδομένα αφορούσαν τα εξής: ηλικία ασθενούς, πρωτεϊνουρία, αιματοουρία, νεφρική λειτουργία



(κρεατινίνη), και από τα παθολογοανατομικά ευρήματα καταγράφηκαν η σφαιρική σπειραματοσκλήρυνση, η εστιακή σπειραματοσκλήρυνση, η σωληναριακή ατροφία, η αρτηριοσκλήρυνση, η αρτηριουαλίωση, η διάμεση ίνωση, η μεσαγγειακή υπερπλασία και ο ενδοτριχοειδικός κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

Από τα εργαστηριακά δεδομένα επιλέχθηκαν να καταγραφούν στην παρούσα εργασία η πρωτεϊνουρία, διότι αποτελεί το συχνότερο εργαστηριακό εύρημα των ασθενών με σπειραματοπάθεια και από τα παθολογοανατομικά κριτήρια η σφαιρική σπειραματοσκλήρυνση ως δείκτης βλάβης του σπειράματος και η σωληναριακή ατροφία ως δείκτης βλάβης των σωληναρίων.

## ΜΕΡΟΣ II: ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

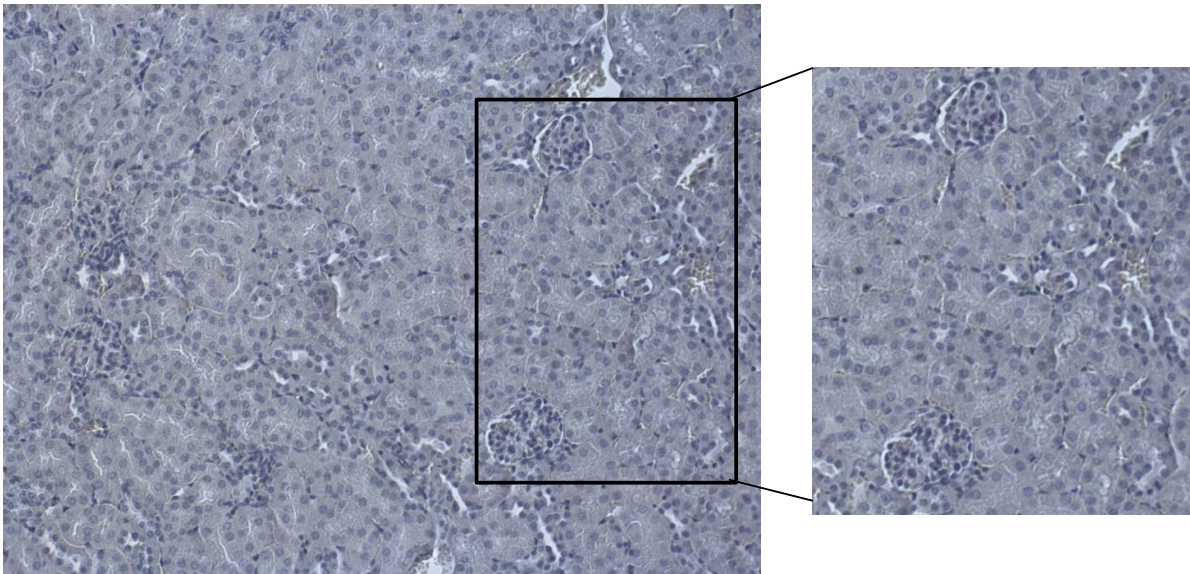
### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### **3.1 Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε ποντίκι**

Καταρχήν, έγινε μελέτη των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό πειραματικού μοντέλου νεφρικής ίνωσης σε ποντίκι.

Διενεργήθηκε ετερόπλευρη απόφραξη ουρητήρα σε ποντίκια, όπως περιγράφεται στην πρώτη ενότητα του Κεφαλαίου 2 του Μέρους II. Οι νεφρικές τομές μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία ως προς την έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών, με τη μέθοδο της ανοσοϋπεροξειδάσης. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε αναγνώριζε όλες τις ισομορφές των 14-3-3 πρωτεϊνών.

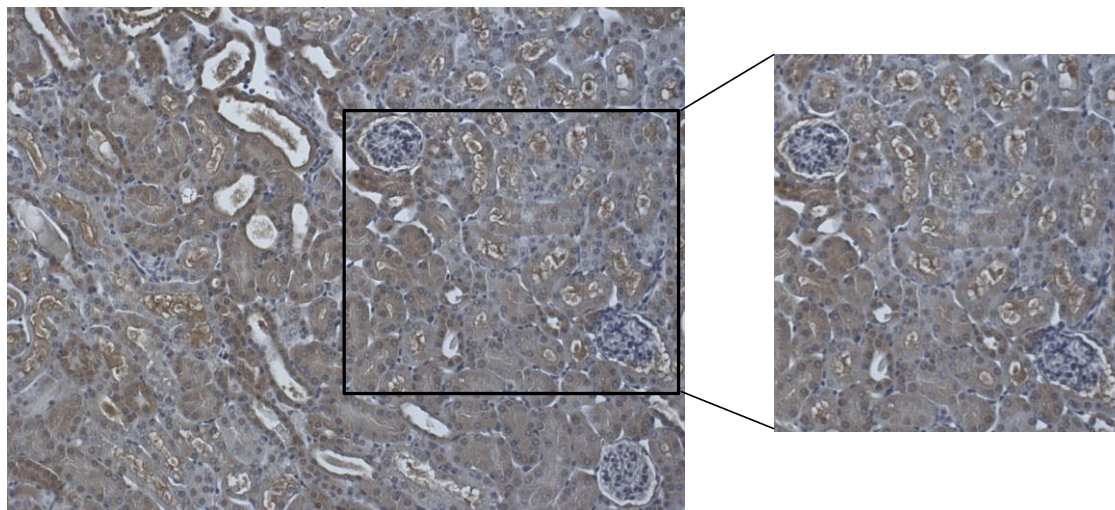
Αρχικά, η πρώτη παρατήρηση ήταν ότι, στα ποντίκια της ομάδας ελέγχου, δηλαδή σε εκείνα στα οποία ο ουρητήρας παρασκευάστηκε αλλά δεν απολινώθηκε, παρατηρείται ελάχιστη έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων. Η βασική έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού είναι ακόμα μικρότερη από αυτή της μυελώδους μοίρας. Δεν παρατηρείται ιδιαίτερη έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα σπειράματα, ούτε στο διάμεσο νεφρικό ιστό.



**Εικόνα 15: Ανοσοϊστοχημεία των 14-3-3 πρωτεϊνών σε νεφρικό ιστό ποντικίου της ομάδας ελέγχου.** Βασική έκφραση 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό. Παρατηρείται ελάχιστη έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα της φλοιώδους μοίρας. Δεν παρατηρείται ιδιαίτερη χρώση στα σπειράματα, ούτε στο διάμεσο ιστό. (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/500).

Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι ο νεφρικός ιστός των ποντικών με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες παρουσίαζε αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων (proximal tubules) αλλά και ήπια αύξηση της έκφρασής τους στο σπείραμα. Στο σπείραμα, η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών φαίνεται ότι αυξάνεται ηπίως κατά μήκος και μεταξύ των τριχοειδικών αγκυλών αλλά και στα επιθηλιακά κύτταρα του περίτονου πετάλου της κάψας του Bowman. Στα άπω σωληνάρια (distal tubules) παρατηρείται, επίσης, αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, οι 14-3-3 πρωτεΐνες φαίνεται να συσσωρεύονται στην αυλική επιφάνεια του κυττάρου δημιουργώντας μια πιο έντονη παρυφή. Έκφραση

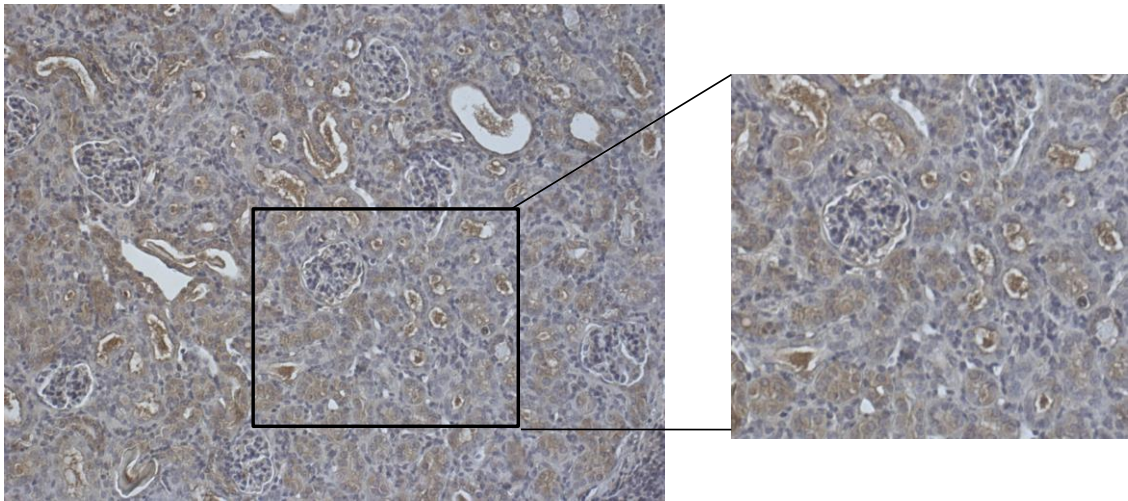
των 14-3-3 πρωτεϊνών στο διάμεσο νεφρικό χώρο δεν είναι εμφανής. Τα ευρήματα απεικονίζονται στην εικόνα 16.



**Εικόνα 16: Ανοσοϊστοχημεία των 14-3-3 πρωτεϊνών σε νεφρικό ιστό της ομάδας των ποντικών με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες.** Παρουσιάζεται αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση στην έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών κυττάρων αλλά και ήπια αύξηση της έκφρασής τους στο σπείραμα.

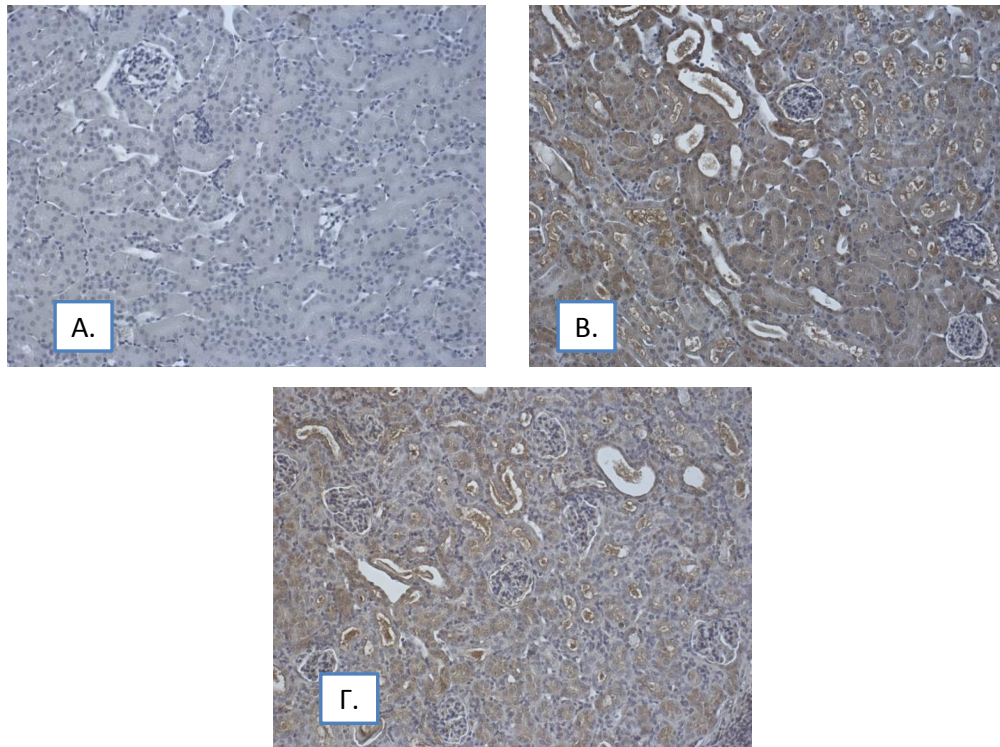
Ακολούθησε μελέτη του νεφρικού ιστού των ποντικών με απολίνωση του ουρητήρα για 8 ημέρες. Στο νεφρικό τους ιστό, επίσης παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών σε σχέση με την έκφρασή τους στο νεφρικό ιστό των ποντικών της ομάδας ελέγχου. Όμως, η αύξηση αυτή φαίνεται να είναι μικρότερη από αυτή του νεφρικού ιστού της ομάδας των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες. Πιο συγκεκριμένα, στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων η αύξηση των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι ηπιότερη ενώ, δεν παρατηρείται έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα σπειράματα (εικόνα 17). Είναι, όμως, πλέον, ιδιαίτερα

χαρακτηριστική η μετακίνηση των 14-3-3 πρωτεϊνών στην αυλική μεμβράνη των κυττάρων των άπω σωληναρίων, των οποίων το κυτταρόπλασμα εμφανίζεται με ηπιότερη χρώση (εικόνα 18).



**Εικόνα 17: Ανοσοϊστοχημεία των 14-3-3 πρωτεϊνών σε νεφρικό ιστό της ομάδας των ποντικών με απολίνωση του ουρητήρα για 8 ημέρες.** Παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών σε σχέση με την έκφρασή τους στο νεφρικό ιστό των ποντικών της ομάδας ελέγχου, όμως αυτή η αύξηση είναι μικρότερη από αυτή του νεφρικού ιστού της ομάδας των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες. Συγκεκριμένα, στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων η αύξηση των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι ηπιότερη ενώ, δεν παρατηρείται έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα σπειράματα.





**Εικόνα 18: Ανοσοϊστοχημεία των 14-3-3 πρωτεϊνών σε νεφρικό ιστό ποντικίου.** Α: Νεφρικός φλοιός της ομάδας ελέγχου. Ελάχιστη έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών παρατηρείται στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων. Δεν παρατηρείται χρώση στα σπειράματα ή στο διάμεσο ιστό. Β. Νεφρικός φλοιός της ομάδας απολίνωσης του ουρητήρα για 2 ημέρες. Η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών είναι αυξημένη στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών κυττάρων. Γ. Νεφρικός φλοιός της ομάδας απολίνωσης του ουρητήρα για 8 ημέρες. Παρατηρείται μείωση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στα κύτταρα (σε σχέση με την εικόνα Β), η οποία μάλιστα τείνει να συγκεντρώνεται στα άπω εσπειραμένα σωληνάκια. Όμως, η αύξηση της έκφρασής τους σε σχέση με την εικόνα Α παραμένει. (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/500).

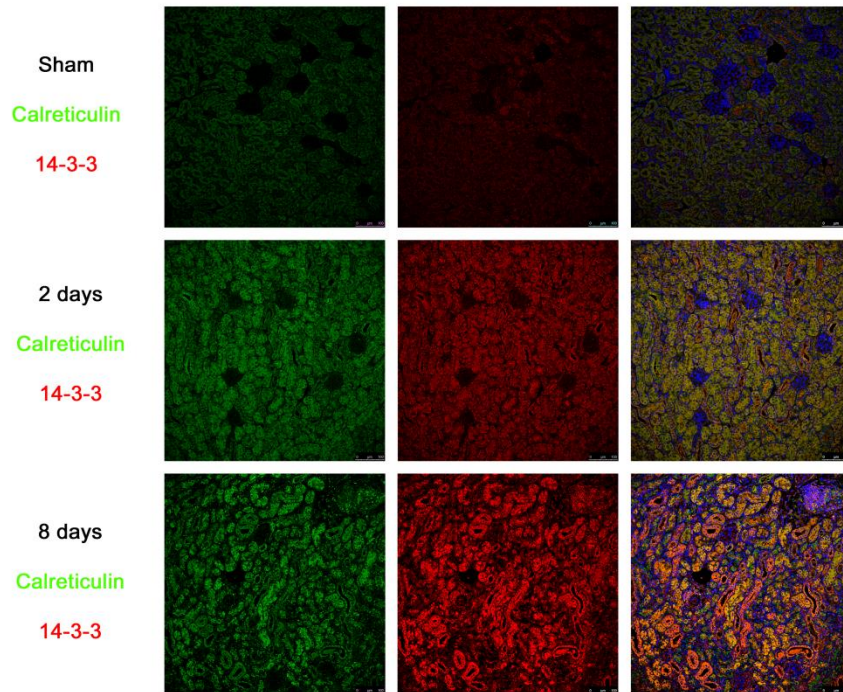
Συμπερασματικά, στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη ουρητήρα διαπιστώνεται στο νεφρικό ιστό αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών. Η αύξηση αυτή φαίνεται πιο μεγάλη στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών κυττάρων και ηπιότερη στο σπείραμα ενώ, στα άπω σωληνάκια χαρακτηριστική είναι η μετακίνησή τους από το κυτταρόπλασμα στην αυλική

μεμβράνη των κυττάρων όπου εντοπίζονται τα κανάλια νατρίου και καλίου που συμμετέχουν στην ομοιόσταση των ηλεκτρολυτών.

### **3.2 Ανοσοφθορισμός των πρωτεϊνών 14-3-3 και της καλρετικουλίνης στο νεφρικό ιστό από μοντέλο UUO σε ποντίκι.**

Στη συνέχεια, ακολούθησε μελέτη της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών και της καλρετικουλίνης σε νεφρικό ιστό ποντικίου, στο ίδιο ζωικό μοντέλο, με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Πρώτα από όλα, με τον ανοσοφθορισμό επιβεβαιώθηκαν εν μέρει τα ευρήματα της ανοσοϊστοχημείας.

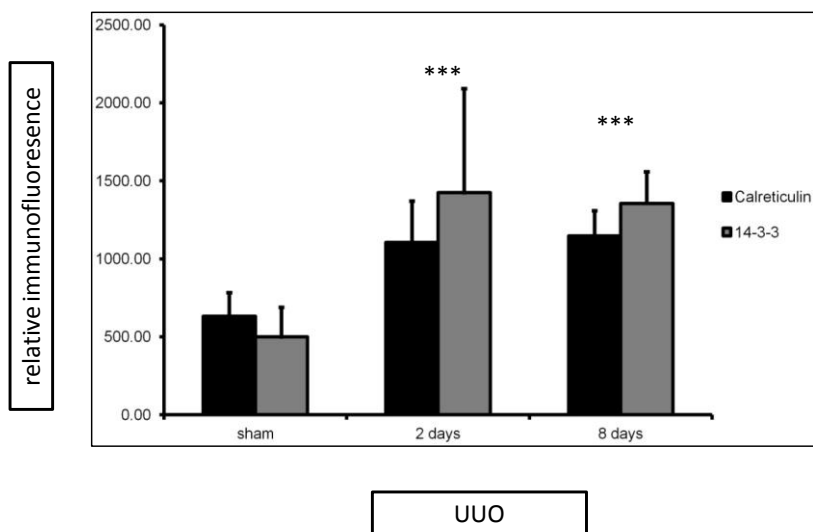
Αρχικά, διαπιστώθηκε μεγάλη αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο νεφρικό ιστό των ποντικών με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες. Ενώ δεν παρατηρείται έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών και της καλρετικουλίνης με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού στο νεφρικό ιστό των ποντικών της ομάδας ελέγχου, η έκφρασή τους παρατηρείται έντονη τόσο στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων όσο και στο κυτταρόπλασμα των άπω σωληναριακών κυττάρων του νεφρικού ιστού των ζώων με απολίνωση ουρητήρα για 2 ημέρες. Η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 κατά μήκος και μεταξύ των τριχοειδικών αγκυλών του σπειράματος αλλά και στα επιθηλιακά κύτταρα του περιτόνου πετάλου της κάψας του Bowman που διαπιστώθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, επιβεβαιώνεται με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Στο νεφρικό φλοιό των ποντικών στους οποίους η απολίνωση του ουρητήρα έγινε για 8 ημέρες παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών και της καλρετικουλίνης σε σχέση με αυτή των ποντικών της ομάδας ελέγχου αλλά, η αύξηση αυτή φαίνεται να είναι μεγαλύτερη και σε σχέση με αυτή των ποντικών της απολίνωσης του ουρητήρα για 2 ημέρες (εικόνα 19).



**Εικόνα 19: Ανοσοφθορισμός των πρωτεϊνών 14-3-3 στο νεφρικό ιστό από μοντέλο ΥΥΟ σε ποντίκι.**

Στο γράφημα 1 απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος του ανοσοφθορισμού (relative immunofluoresence) στα ποντίκια.



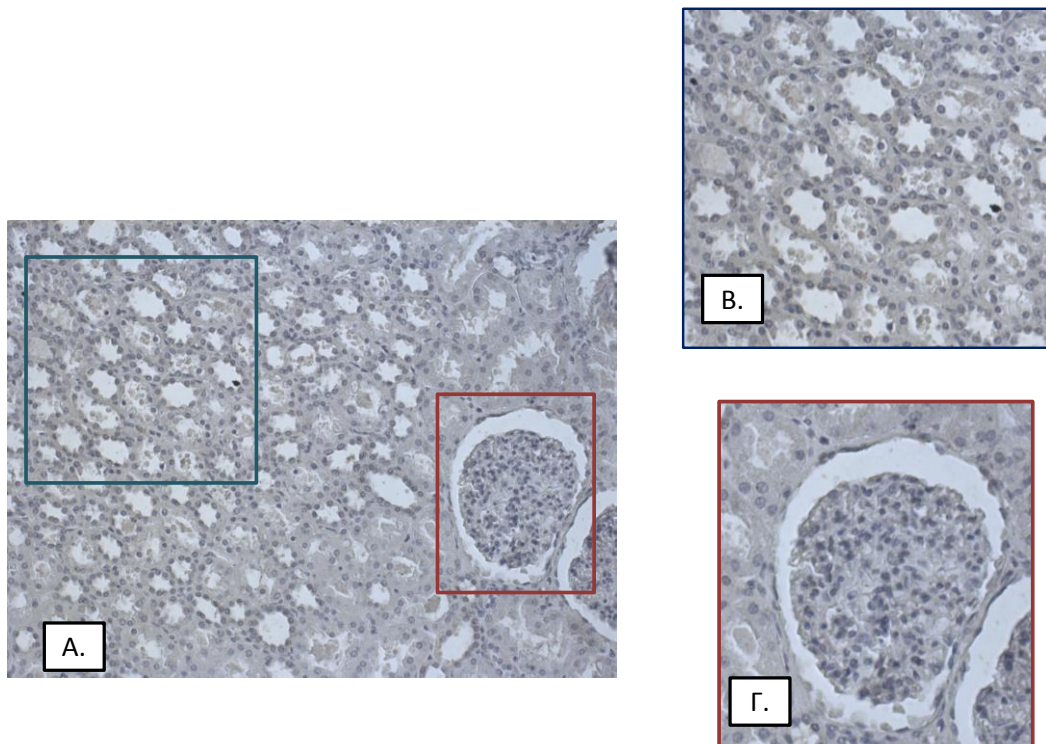


**Γράφημα 1: Ποσοτικοποίηση του ανοσοφθορισμού (relative immunofluoresence) στα ποντίκια. Με μαύρο απεικονίζεται η καλρετικουλίνη και με γκρι οι πρωτεΐνες 14-3-3.**

### **3.3 Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών**

#### **3.3.1 Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με καρκίνο νεφρού (ομάδα ελέγχου)**

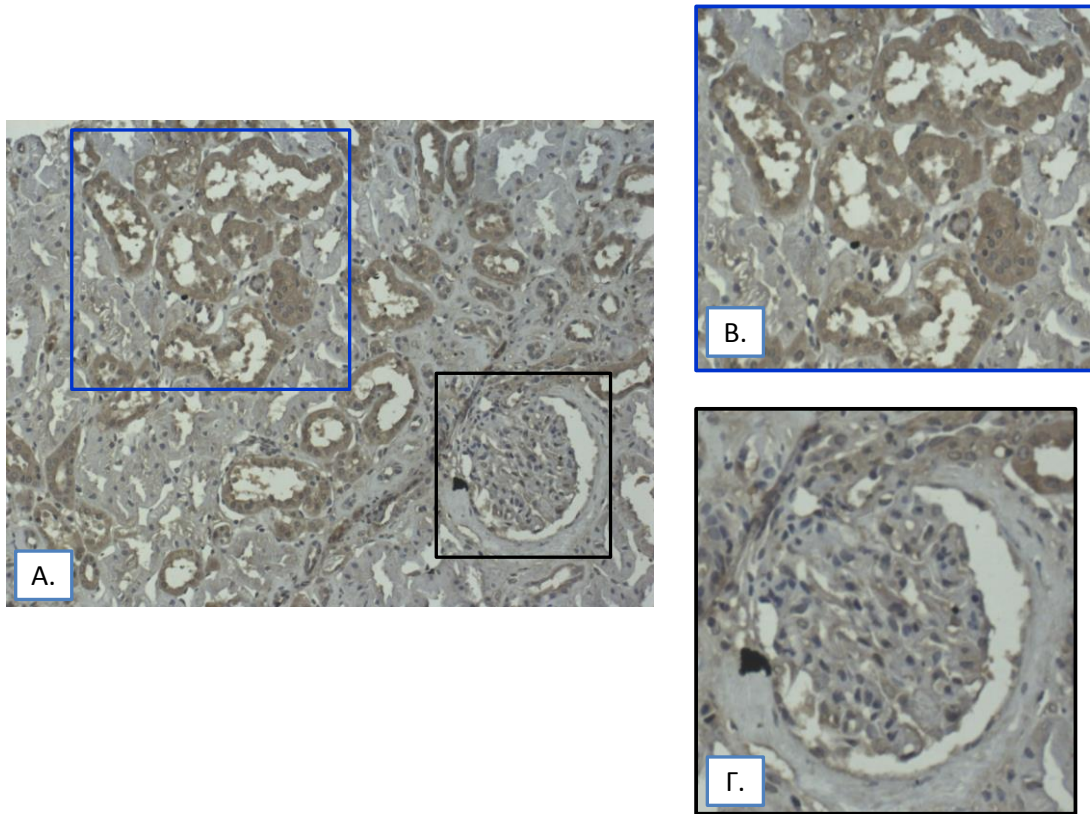
Αρχικά, μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 σε φυσιολογικό ιστό από βιοψίες ασθενών με καρκίνο νεφρού (ομάδα ελέγχου). Η πρώτη παρατήρηση ήταν η μηδαμινή έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων. Η βασική έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού είναι ακόμα μικρότερη από αυτή της μυελώδους μοίρας. Δεν παρατηρείται έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στα σπειράματα, ούτε στο διάμεσο νεφρικό ιστό (εικόνα 20).



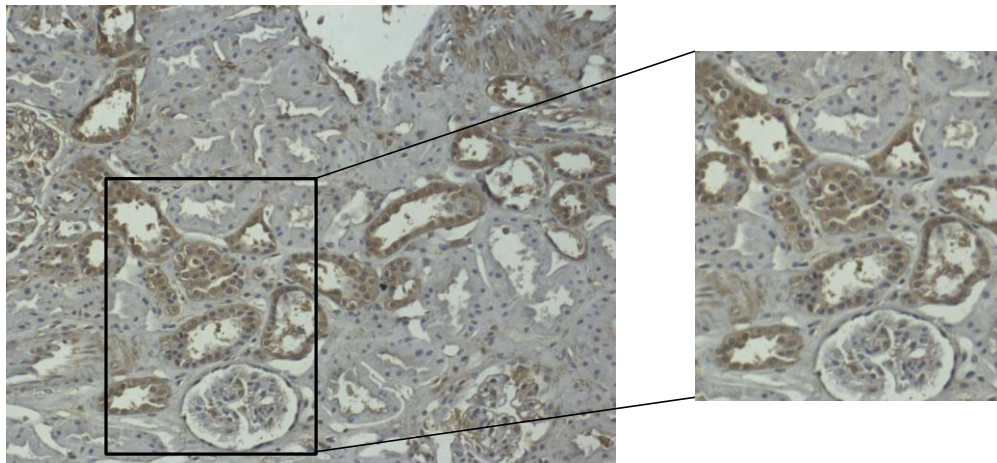
**Εικόνα 20:** Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με καρκίνο νεφρού (ομάδα ελέγχου) [A]. Μηδαμινή έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στα σωληνάρια [B]. Απουσία έκφρασης των πρωτεϊνών 14-3-3 στο σπείραμα [Γ] (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/4000).

### 3.3.2 Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με IgA νεφροπάθεια

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 σε ιστό από βιοψίες ασθενών με IgA νεφροπάθεια. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των άπω σωληναριακών κυττάρων (distal tubules). Στο σπείραμα, παρατηρείται απουσία έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών, όπως και μεταξύ των τριχοειδικών αγκυλών αλλά και στα επιθηλιακά κύτταρα του περίτονου πετάλου της κάψας του Bowman. Στα άπω σωληνάρια (distal tubules), όπου παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, οι 14-3-3 πρωτεΐνες φαίνεται να συσσωρεύονται στην αυλική επιφάνεια του κυττάρου δημιουργώντας μια πιο έντονη παρυφή. Έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο διάμεσο νεφρικό χώρο δεν είναι εμφανής.



**Εικόνα 21: Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με IgA νεφροπάθεια [A]. Υψηλή έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στα σωληνάρια, κυρίως στα άπω σωληνάρια [B]. Απουσία έκφρασης των πρωτεϊνών 14-3-3 στο σπείραμα [Γ] (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/4000)**

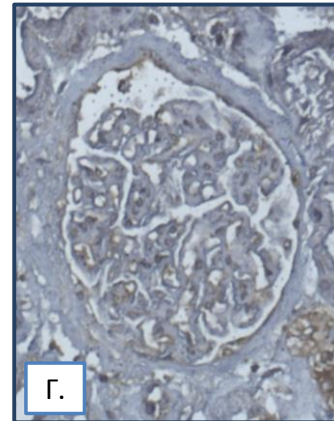
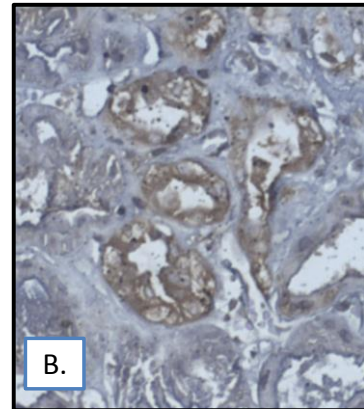
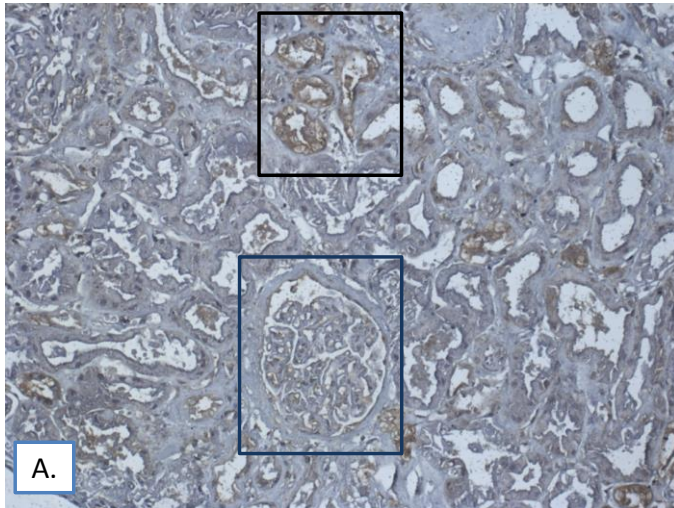


**Εικόνα 22: Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με IgA νεφροπάθεια**

### **3.3.3 Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα**

Σχετικά με τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών 14-3-3 σε ιστό από βιοψίες ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα, τα δεδομένα ήταν παρόμοια με αυτά της IgA νεφροπάθειας. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των άπω σωληναριακών κυττάρων (distal tubules), ενώ στο σπείραμα, δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών. Στα άπω σωληνάρια (distal tubules), όπου παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, οι 14-3-3 πρωτεΐνες φαίνεται να συσσωρεύονται στην αυλική επιφάνεια του κυττάρου δημιουργώντας μια πιο έντονη παρυφή. Αντίθετα στα εγγύς εσπειραμένα δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη έκφραση των πρωτεϊνών. Έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο διάμεσο νεφρικό χώρο δεν είναι εμφανής.

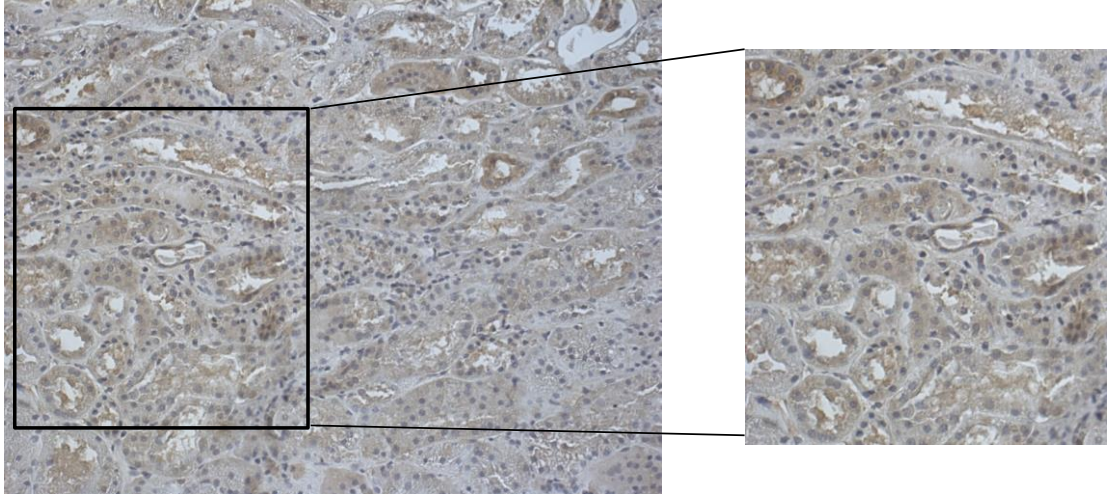




**Εικόνα 23: Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα [A] Υψηλή έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στα σωληνάρια, κυρίως στα άπω σωληνάρια και σχεδόν μηδαμινή στα εγγύς σωληνάρια [B]. Απουσία έκφρασης των πρωτεϊνών 14-3-3 στο σπείραμα [Γ] (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/4000)**

### **3.3.4 Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με νεφρίτιδα του ΣΕΛ**

Στις βιοψίες των ασθενών με νεφρίτιδα του ΣΕΛ, η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές σε σχέση με την έκφραση στις βιοψίες ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα και IgA νεφροπάθεια. Συγκεκριμένα, η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών κυττάρων είναι πολύ πιο ήπια σε σχέση με τις δύο προηγούμενες παθήσεις. Στο σπείραμα δεν παρατηρήθηκε έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών. Γενικότερα, η έκφραση των 14-3-3 είναι διάχυτη και μέτριας εντάσεως, με λίγο πιο έντονη ένταση στα άπω σωληνάρια (distal tubules). Έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο διάμεσο νεφρικό χώρο δεν είναι εμφανής.

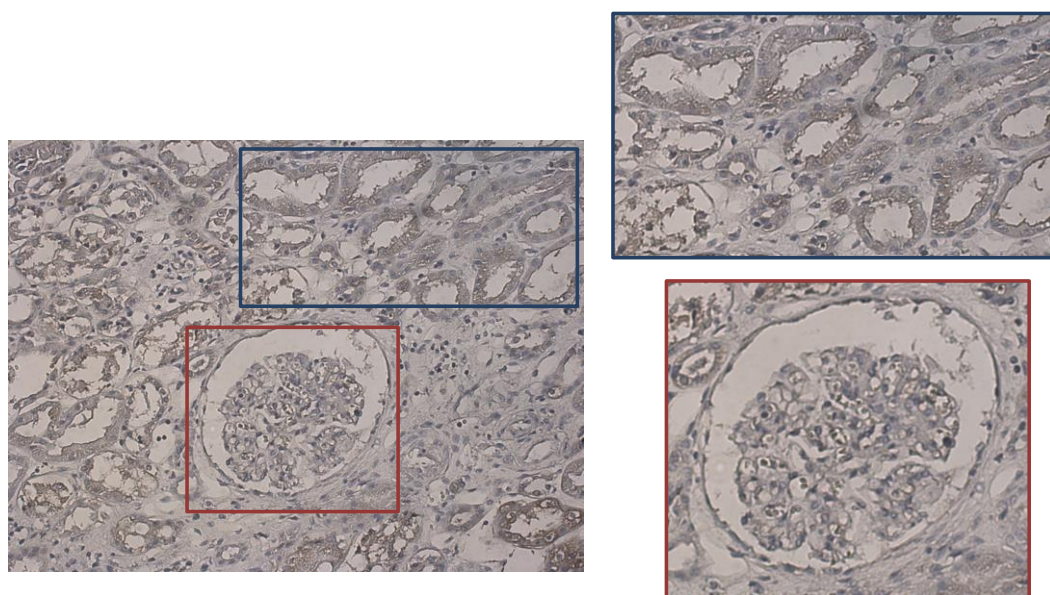


**Εικόνα 24: Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με νεφρίτιδα του ΣΕΛ. Μέτρια έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στα σωληνάρια, κυρίως στα άπω σωληνάρια και σχεδόν μικρότερη στα εγγύς σωληνάρια. Απουσία έκφρασης των πρωτεϊνών 14-3-3 στο σπείραμα (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/4000).**



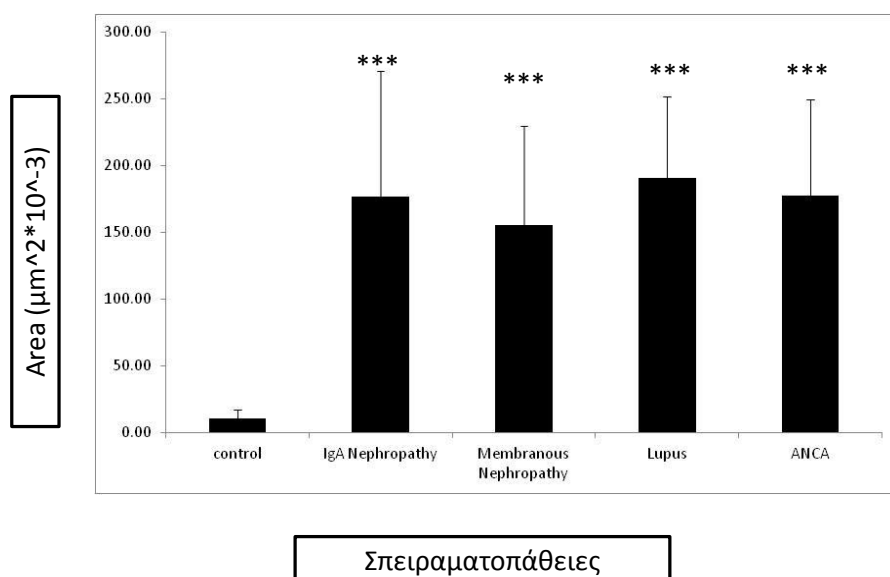
### 3.3.5 Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας

Στις βιοψίες των ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας, η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή στη νεφρίτιδα του ΣΕΛ και ακόμα μικρότερη σε σχέση με την έκφραση στις βιοψίες ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα και IgA νεφροπάθεια. Συγκεκριμένα, η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των σωληναριακών κυττάρων είναι πολύ ήπια. Στο σπείραμα δεν παρατηρήθηκε έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών. Γενικότερα, η έκφραση των 14-3-3 στα σωληνάρια είναι διάχυτη και ήπιας εντάσεως. Έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο διάμεσο νεφρικό χώρο δεν είναι εμφανής.



**Εικόνα 25:** Ανοσοϊστοχημεία των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας. Ήπια έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 στα σωληνάρια σε σχέση με τις προηγούμενες τρεις παθήσεις. Απουσία έκφρασης των πρωτεϊνών 14-3-3 στο σπείραμα (Αντίσωμα κατά των 14-3-3 πρωτεϊνών 1/4000).

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας στις βιοψίες των ασθενών, που απεικονίζονται στο διάγραμμα 2. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα παρατηρείται ότι στη νεφρίτιδα του ΣΕΛ όπως και στις σπειραματονεφρίτιδες σχετιζόμενες με ANCA αγγείτιδες οι τιμές είναι εξίσου υψηλές με αυτή που αντιστοιχεί στην IgA νεφροπάθεια. Αυτό συμβαίνει γιατί στο διάγραμμα απεικονίζεται η έκταση θετικής χρώσης (area) που στην νεφρίτιδα του ΣΕΛ και στις σπειραματονεφρίτιδες σχετιζόμενες με ANCA αγγείτιδες η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 παρουσιάζεται πιο διάχυτη, ενώ στη μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα και στην IgA νεφροπάθεια είναι πιο εντοπισμένη.



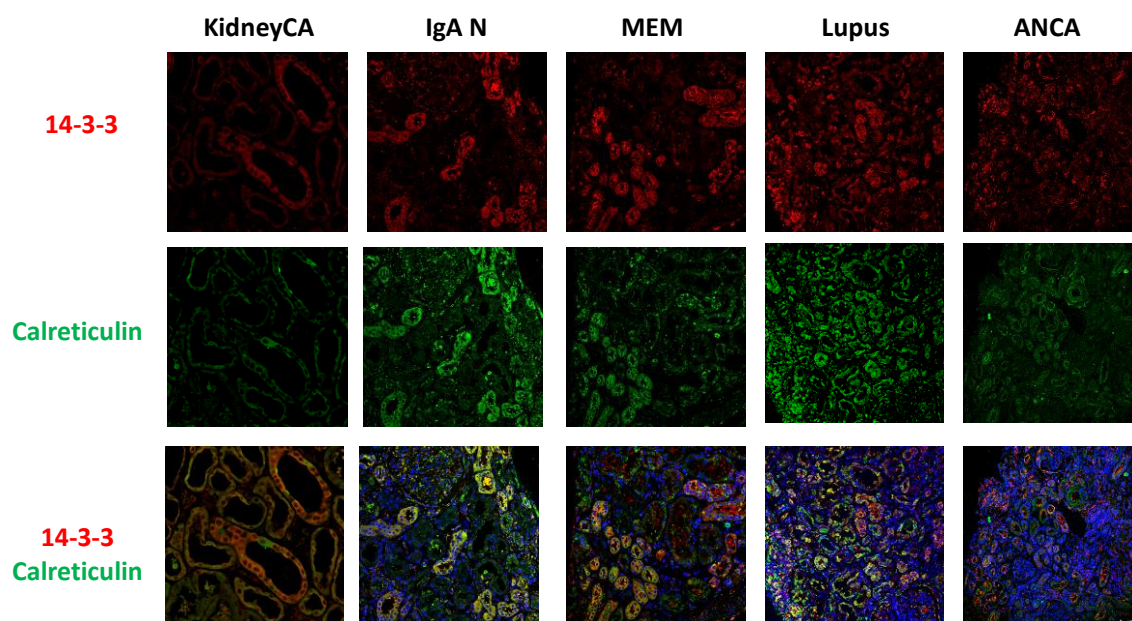
**Διάγραμμα 2:** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας στους ασθενείς. Μετρήθηκε η περιοχή θετικής χρώσης (area).

### 3.4 Ανοσοφθορισμός των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό ασθενών.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών 14-3-3 και της καλρετικουλίνης στο νεφρικό ιστό ασθενών με IgA νεφροπάθεια, μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα, νεφρίτιδα του ΣΕΛ. Πρώτα από όλα, με τον ανοσοφθορισμό επιβεβαιώθηκαν τα ευρήματα της ανοσοϊστοχημείας.

Αρχικά, διαπιστώθηκε μηδαμινή έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών και της καλρετικουλίνης στον φυσιολογικό νεφρικό ιστό των ασθενών με καρκίνο νεφρού. Αντίθετα στις υπόλοιπες παθήσεις υπάρχει κάποιου βαθμού έκφραση και των 14-3-3 και της καλρετικουλίνης, οι οποίες ποικίλουν σε ένταση και κατανομή. Στην IgA νεφροπάθεια, η ένταση της έκφρασης είναι σημαντική αλλά το αξιοσημείωτο είναι η κατανομή που παρουσιάζει η έκφραση και των πρωτεϊνών 14-3-3 και της καλρετικουλίνης. Παρατηρείται, έκφραση και των δύο κατηγοριών πρωτεϊνών κυρίως στα άπω σωληνάρια και σχεδόν καθόλου στα εγγύς. Παρόμοια ένταση και κατανομή της έκφρασης των 14-3-3 και της καλρετικουλίνης παρουσιάζεται και στον νεφρικό ιστό από βιοψίες ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα. Αντίθετα με τις προαναφερθείσες παθήσεις, στις βιοψίες των ασθενών με νεφρίτιδα ΣΕΛ, η έκφραση των πρωτεϊνών παρατηρείται έντονη τόσο στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων όσο και στο κυτταρόπλασμα των άπω σωληναριακών κυττάρων, με κάποιου βαθμού υπεροχή της έκφρασης στα άπω σωληνάρια. Σχετικά με την ένταση της έκφρασης είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην IgA νεφροπάθεια και στην μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα. Τέλος, στο νεφρικό ιστό των ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας παρατηρείται πολύ μειωμένη διάχυτη έκφραση και των πρωτεϊνών 14-3-3 και της καλρετικουλίνης (εικόνα 26).

Επιπλέον, ενώ δεν παρατηρείται έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών και της καλρετικουλίνης με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού στα σπειράματα.

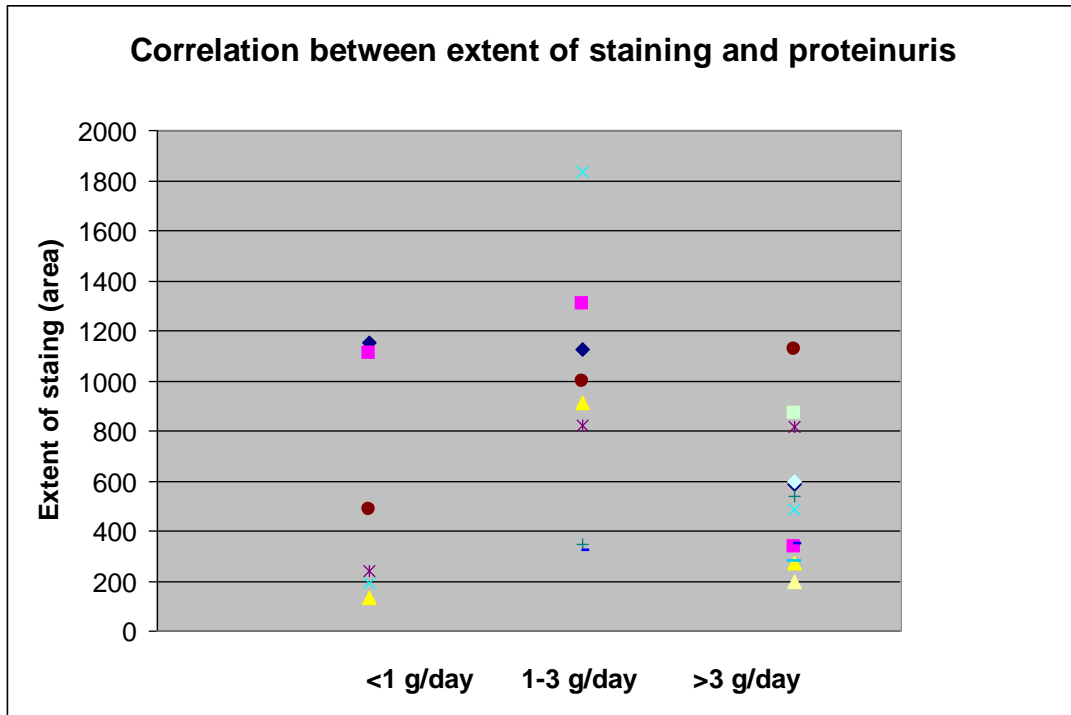


**Εικόνα 26: : Διπλός ανοσοφθορισμός των πρωτεϊνών 14-3-3 και της καλρετικουλίνης σε νεφρικό ιστό ασθενών με IgA νεφροπάθεια, μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα, νεφρίτιδα ΣΕΛ και σπειραματονεφρίτιδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας. Με κόκκινο απεικονίζονται οι 14-3-3 και με πράσινο η καλρετικουλίνη.**

### 3.5 Αξιολόγηση κλινικών δεδομένων και συσχέτισή τους με τα ευρήματα από την ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημείας στους ασθενείς

Στην παρούσα μελέτη έγινε μία πρώτη προσπάθεια συσχέτισης των ευρημάτων από την ποσοτικοποίηση της έκφρασης της 14-3-3 στις βιοψίες των ασθενών με IgA νεφροπάθειας, της μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας, της νεφρίτιδας του ΣΕΛ και τέλος της σπειραματονεφρίτιδας σχετιζόμενης με ANCA αγγειίτιδες.

Ασθενής	Παθηση	proteinuria g/24 hours	global glomerulosclerosis >25%	tubular atrophy	Area
1	IgA	<1	<25%	<25%	1152,771
2	IgA	1-3	>50%	>50%	1128,446
3	IgA	<1	<25%	<25%	1112,829
4	IgA	>3	<25%	<25%	585,502
5	IgA	1-3	<25%	<25%	1306,563
6	IgA	1-3	25-50%	25-50%	911,695
7	IgA	>3	>50%	>50%	335,349
8	IgA	<1	<25%	<25%	136,283
9	IgA	1-3	25-50%	<25%	1837,114
10	IgA	<1	25-50%	<25%	193,916
11	IgA	<1	25-50%	<25%	242,544
12	Mem	>3	<25%	<25%	270,604
13	Mem	>3	<25%	<25%	483,886
14	Mem	>3	25-50%	25-50%	818,188
15	Mem	>3	<25%	<25%	1123,299
16	Mem	>10	<25%	25-50%	540,960
17	Mem	>3	<25%	<25%	348,210
18	Mem	>3	<25%	<25%	276,370
19	Mem	1-3	<25%	<25%	821,044
20	Mem	>3	<25%	<25%	600,895
21	Lupus	>3	>25%	>25%	1118,731
22	Lupus	1-3	<25%	<25%	1195,272
23	ANCA	<1	<25%	<25%	1013,894
24	ANCA	<1	<25%	25-50%	484,405
25	ANCA	>3	25-50%	25-50%	867,461
26	ANCA	1-3	<25%	25-50%	996,982
27	ANCA	1-3	>50%	>50%	349,195
28	ANCA	1-3	<25%	<25%	319,013
29	ANCA	>3	25-50%	25-50%	196,560



Διάγραμμα 3: Συσχετισμός πρωτεϊνουρίας με την περιοχή θετικής χρώσης (area) στους ασθενείς.

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 3, το μέγεθος της πρωτεϊνουρίας ταξινομήθηκε σε 3 κατηγορίες: μικρότερη από 1g/ημέρα, 1-3g/ημέρα και πάνω από 3g/ημέρα. Στην συνέχεια εκτιμήθηκε η περιοχή θετικής χρώσης για όλα τα δείγματα ασθενών με IgA νεφροπάθεια, μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα, νεφρίτιδα του ΣΕΛ και σπειραματονεφρίτιδα σχετιζόμενη με ANCA-αγγειίτιδες. Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα δεν παρουσιάζεται συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων πρωτεϊνουρίας και της έκτασης της θετικής χρώσης. Εξέταση των αντίστοιχων τιμών για κάθε περίπτωση ξεχωριστά, δεν δείχνει επίσης καμία συσχέτιση. Για να εξακριβωθεί, όμως, αν πράγματι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην πρωτεϊνουρία και την έκφραση των 14-3-3 απαιτείται περαιτέρω έρευνα και στατιστική ανάλυση.

## ΜΕΡΟΣ ΙΙ: ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος (ΧΝΝ) αποτελεί ένα νόσημα που προσβάλλει ένα μεγάλο μέρος πληθυσμού παγκοσμίως και στο τελικό της στάδιο μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο αν δεν αντιμετωπιστεί με εξωνεφρική κάθαρση ή μεταμόσχευση. Επιπλέον, το κόστος νοσηλείας και θεραπείας των ασθενών με ΧΝΝ είναι μεγάλο και πολύ σημαντικό για όλες τις χώρες του κόσμου. Βάσει αυτών των δεδομένων, στόχος της Διεθνούς Εταιρίας Νεφρολογίας είναι η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση της ΧΝΝ (3).

Τα αίτια της ΧΝΝ είναι πολλά και, ανεξάρτητα από το αίτιο που την προκαλεί, η εξέλιξη της οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη νεφρική ίνωση, που προκαλείται. Η νεφρική ίνωση, που είναι το τελικό αποτέλεσμα πολλών νεφρικών νοσημάτων, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και, σαν πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διεργασία, συμμετέχουν σε αυτή πολλοί μοριακοί και κυτταρικοί μεσολαβητές, οι οποίοι μελετώνται και ήδη αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους.

Στα ποντίκια, στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη του ουρητήρα διαπιστώθηκε ότι, η calreticulin, μια πολυλειτουργική δεσμεύουσα το ασβέστιο πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), υπερεκφράζεται από τα αρχικά στάδια της νεφρικής ινωτικής διεργασίας και, κυρίως, στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα. Σε προηγούμενες μελέτες διερευνήθηκε επισταμένως ο ρόλος της καλρετικουλίνης στη νεφρική ίνωση και, πιο συγκεκριμένα, ο τρόπος μεταβολής των ιδιοτήτων των επιθηλιακών νεφρικών κυττάρων κατά την υπερέκφρασή της. Δημιουργήθηκαν κυτταρικές σειρές στις οποίες υπήρχε υπερέκφραση της καλρετικουλίνης σε αυξανόμενο βαθμό (80). Μέσω της Πρωτεωμικής Ανάλυσης, λοιπόν, βρέθηκαν πρωτεΐνες που η έκφραση τους αλλάζει όταν υπερεκφράζεται η καλρετικουλίνη. Από αυτές, οι πρωτεΐνες 14-3-3 επιλέγησαν ως οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου ενδιαφέροντος προς περαιτέρω μελέτη. Αρχικά, στο μοντέλο νεφρικής ίνωσης που προκαλείται από ετερόπλευρη απόφραξη ουρητήρα,

διαπιστώθηκε, με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και του ανοσοφθορισμού, ότι οι 14-3-3 πρωτεΐνες υπερεκφράζονται στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα από τα αρχικά στάδια της νωτικής διεργασίας. Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι στο νεφρικό ιστό του μοντέλου νεφρικής ίνωσης παρατηρείται υπερέκφραση όλων των mRNAs των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών που μελετήθηκαν. Στις προηγούμενες μελέτες, θεωρήθηκε ότι η υπερέκφραση της καλρετικουλίνης αποτελεί ένα συνεχές βλαπτικό ερέθισμα στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα. Αρχικά, με την Πρωτεωμική Ανάλυση επιβεβαιώθηκε η υπερέκφραση της καλρετικουλίνης στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Στη συνέχεια, με την κατηγοριοποίηση των δεδομένων της Πρωτεωμικής Ανάλυσης διαπιστώθηκε ότι, η υπερέκφραση της καλρετικουλίνης στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα οδηγεί σε τροποποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών που συσχετίζονται με τη φλεγμονή. Τέλος, ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Σε αυτά κεντρικό ρόλο φάνηκε να διαδραματίζουν οι 14-3-3.

Η Πρωτεωμική Ανάλυση έδωσε μια πληθώρα πληροφοριών από τις ταυτοποιημένες διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες. Πολλές από αυτές παρουσιάζουν ενδιαφέρον όμως, τελικά, βάσει βιβλιογραφικής αναζήτησης και μελέτης και, βάσει εμπλοκής τους σε κεντρικές θέσεις στα δίκτυα των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που σχηματίστηκαν, οι πρωτεΐνες 14-3-3 φάνηκε να αποτελούν τις πρωτεΐνες μεγαλύτερου ενδιαφέροντος προς περαιτέρω μελέτη. Μέχρι σήμερα, ο ρόλος και η συμμετοχή των πρωτεϊνών 14-3-3 στη νεφρική ίνωση δεν έχει μελετηθεί πλήρως. Πρωτεωμικές μελέτες των Prakoura N et al. και Kyrgiou KP et al. στο πειραματικό μοντέλο της μονόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης έδειξαν ότι από τα αρχικά στάδια ανάπτυξης της νεφρικής ίνωσης υπάρχει υπερέκφραση της πρωτεΐνης καλρετικουλίνης. Παράλληλα, διαπιστώθηκε πως στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου που υπερεκφράζουν καλρετικουλίνη παρατηρήθηκε υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών οι οποίες φάνηκε ότι, όχι μόνο συμμετέχουν στα δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αλλά και ότι κατέχουν κεντρικό ρόλο (79).

Ενδελεχείς μελέτες της οικογένειας αυτής σε νεφρικές παθήσεις (σπειραματοπάθειες) από ανθρώπινο υλικό δεν έχουν πραγματοποιηθεί. Στην παρούσα μελέτη, έγινε διερεύνηση της έκφρασης της οικογένειας των 14-3-3 πρωτεϊνών, αρχικά στο ζωικό μοντέλο και στην συνέχεια σε βιοψίες ασθενών με σπειραματοπάθειες (IgA νεφροπάθεια, μεμβρανώδη νεφροπάθεια, νεφρίτιδα του συστηματικού ερυθματώδη λύκου και νεφροπάθεια σχετιζόμενη με ANCA αγγειίτιδες) και επιχειρήθηκε συσχέτισμός των ευρημάτων με τα κλινικά δεδομένα από το ιστορικό αυτών των ασθενών.



Καταρχήν, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο νεφρικής ίνωσης UUO σε τρεις διαφορετικούς χρόνους οι οποίοι ήταν ο χρόνος μηδέν, οι 2 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα και οι 8 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα. Στο μοντέλο αυτό, σε ποντίκια, μελετήθηκε η ταυτόχρονη έκφραση στο νεφρικό ιστό όλων των ισομορφών των 14-3-3 πρωτεϊνών με τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού.

Η πρώτη διαπίστωση ήταν ότι, οι πρωτεΐνες 14-3-3 εκφράζονται φυσιολογικά στο νεφρικό ιστό. Η βασική έκφρασή τους στα κύτταρα των σωληναρίων είναι εμφανής, ενώ δεν παρατηρείται ιδιαίτερη έκφρασή τους στο σπείραμα ούτε στο διάμεσο ιστό. Εξαιτίας της διαφορετικής λειτουργικής σημασίας που έχει το κάθε ανατομικό τμήμα του νεφρού αλλά και εξαιτίας της διαφορετικής έκφρασης που παρουσιάζουν οι 14-3-3 πρωτεΐνες σε αυτά, η αξιολόγηση και η περιγραφή της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών έγινε βάσει ανατομικής περιοχής. Διαπιστώθηκε ότι ο νεφρικός ιστός των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες παρουσίαζε αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων αλλά και αύξηση της έκφρασής τους στο σπείραμα. Στο σπείραμα, η έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών φαίνεται ότι αυξάνεται κατά μήκος και μεταξύ των τριχοειδικών αγκυλών αλλά και στα επιθηλιακά κύτταρα του περίτονου πετάλου της κάψας του Bowman. Στα άπω σωληνάρια παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, οι 14-3-3 πρωτεΐνες φαίνεται να συσσωρεύονται στην αυλική επιφάνεια του κυττάρου δημιουργώντας μια πιο έντονη παρυφή. Επιπλέον, ο νεφρικός ιστός των ζώων με απολίνωση του ουρητήρα για 8 ημέρες φαίνεται να μην να παρουσιάζει αύξηση της έκφρασης των 14-3-3 πρωτεϊνών, όχι όμως τόσο αυξημένη όσο για τις 2 ημέρες. Επίσης, στα ποντίκια με απολίνωση του ουρητήρα για 2 ημέρες η χρώση παρουσιάζει πιο ευρεία κατανομή στα σωληνάρια, αντίθετα με τα ποντίκια με απολίνωση του ουρητήρα για 8 ημέρες που παρουσιάζουν συγκέντρωση της χρώσης κυρίως στα άπω σωληνάρια. Στον ανοσοφθορισμό, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών στα ζώα με απολίνωση ουρητήρα για 2 ημέρες σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου, εύρημα που συνάδει με αυτά της ανοσοϊστοχημείας. Από την άλλη πλευρά στον ανοσοφθορισμό παρατηρήθηκε εντονότερη έκφραση των 14-3-3 στα ζώα με απολίνωση ουρητήρα για 8 ημέρες σε σχέση με την έκφραση στα ζώα με απολίνωση ουρητήρα για 2 ημέρες, εύρημα που διαφοροποιείται από αυτά της ανοσοϊστοχημείας..

Ένα επιπρόσθετο και ενδιαφέρον στοιχείο είναι η διαπίστωση ότι, στα άπω σωληνάρια, οι 14-3-3 πρωτεΐνες φαίνεται να συσσωρεύονται στην αυλική επιφάνεια

του κυττάρου δημιουργώντας μια πιο έντονη παρυφή. Η συσσώρευση φαίνεται ότι ξεκινά από τις 2 ημέρες απολίνωσης του ουρητήρα και μεγιστοποιείται στις 8 ημέρες. Στην αυλική μεμβράνη του τελικού τμήματος των άπω εσπειραμένων σωληναρίων και των αθροιστικών σωληναρίων βρίσκεται το κανάλι Νατρίου (Epithelial Na<sup>+</sup> Channel, ENaC) του οποίου η δράση, υπό την επίδραση της ορμόνης αλδοστερόνης, είναι η επαναρρόφηση νατρίου. Η κυτταρική λειτουργία του μυελώδους του ΠΑΣ να διατηρεί υπέρτονο το διάμεσο μυελώδη ιστό που επιτρέπει τη μέγιστη συμπύκνωση των ούρων, ενώ το φλοιώδες τμήμα εξακολουθεί την αραίωση του σωληναριακού υγρού επιτρέποντας το σχηματισμό ούρων μέγιστης αραίωσης. Η νατριοευαισθησία στα πλαίσια της αρτηριακής υπέρτασης, η οποία είναι χαρακτηριστικό κλινικό γνώρισμα σχεδόν όλων των νεφρικών νοσημάτων, συσχετίζεται με αυξημένη επαναρρόφηση νατρίου από το νεφρό. Στην παρούσα εργασία, διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση της calreticulin στα σωληναριακά κύτταρα συσχετίζεται με υπερέκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών, οι οποίες, στον άπω νεφρώνα, συσσωρεύονται στην αυλική επιφάνεια των σωληναριακών κυττάρων. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι, η μετακίνηση των 14-3-3 πρωτεϊνών στην αυλική επιφάνεια των κυττάρων του άπω νεφρώνα επηρεάζει μονοπάτια που δρουν στο κανάλι ENaC, με αποτέλεσμα την συνέχιση της επαναρρόφησης νατρίου. Από την άλλη, η αύξηση της καλρετικουλίνης, πιθανά, αυξάνει την έκφραση και τη δραστηριότητα του ENaC, συνεισφέροντας στην παθογένεια της αρτηριακής υπέρτασης που είναι ένα από τα κυριότερα κλινικά σημεία των περισσότερων νεφρικών νοσημάτων.

Στην συνέχεια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 σε νεφρικό ιστό από βιοψίες ασθενών με σπειραματοπάθειες. Αρχικά, η μελέτη έγινε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Οι σπειραματοπάθειες που μελετήθηκαν ήταν η IgA νεφροπάθεια, η μεμβρανώδης νεφροπάθεια, η νεφρίτιδα του συστηματικού ερυθματώδη λύκου και η νεφροπάθεια σχετιζόμενη με ANCA αγγειίτιδες. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ιστός από βιοψίες ασθενών με καρκίνο νεφρού. Καταρχάς, στην ομάδα ελέγχου (φυσιολογικός ιστός) η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 ήταν σχεδόν απύσχα. Αντίθετα, στις σπειραματοπάθειες παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης τους, η οποία μάλιστα διέφερε ανάμεσα στις παθήσεις. Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των 14-3-3 ήταν εντονότερα στα σωληνάκια και συγκεκριμένα στα άπω σωληνάκια σε σχέση με τα εγγύς. Αυτό που είναι αξιοσημείωτο είναι ότι παρόλο που πρόκειται για σπειραματοπάθειες και η βλάβη σύμφωνα και με τα παθολογοανατομικά ευρήματα έγκειται κυρίως στα σπειράματα, ενώ τα σωληνάκια συνήθως βλάπτονται σε πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου, στη

παρούσα μελέτη η έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στα σπειράματα ήταν απύουσα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στην IgA νεφροπάθεια όπως και στη μεμβρανώδη σπειραματονεφρίδα η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την έκφραση στη νεφρίδα του ΣΕΛ και ακόμα μεγαλύτερη συγκριτικά με την έκφραση στην νεφροπάθεια σχετιζόμενη με ANCA αγγειίτιδες, όπου η έκφραση τείνει να μειώνεται αρκετά.

Τα συγκεκριμένα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού, όπου μελετήθηκαν στις ίδιες παθήσεις η έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 και της καλρετικουλίνης. Καταρχήν, φάνηκε ξεκάθαρα ότι όπου αυξάνεται η έκφραση των 14-3-3 αυξάνεται και η έκφραση της καλρετικουλίνης και αντίστροφα, γεγονός που υποδηλώνει την συσχέτιση και την πιθανή αλληλεπίδραση αυτών των πρωτεϊνών. Στον φυσιολογικό νεφρικό ιστό των ασθενών με καρκίνο νεφρού διαπιστώθηκε μηδαμινή έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών και της καλρετικουλίνης. Αντίθετα στις υπόλοιπες παθήσεις υπάρχει κάποιου βαθμού έκφραση και των 14-3-3 και της καλρετικουλίνης, οι οποίες ποικίλουν σε ένταση και κατανομή. Στην IgA νεφροπάθεια, η ένταση της έκφρασης είναι σημαντική αλλά το αξιοσημείωτο είναι η κατανομή που παρουσιάζει η έκφραση και των πρωτεϊνών 14-3-3 και της καλρετικουλίνης, κι αυτή αφορά κυρίως στα άπω σωληνάρια και σχεδόν καθόλου στα εγγύς. Παρόμοια ένταση και κατανομή της έκφρασης των 14-3-3 και της καλρετικουλίνης παρουσιάζεται και στον νεφρικό ιστό από βιοψίες ασθενών με μεμβρανώδη σπειραματονεφρίδα. Αντίθετα με τις προαναφερθείσες παθήσεις, στις βιοψίες των ασθενών με νεφρίδα ΣΕΛ, η έκφρασή των πρωτεϊνών παρατηρείται έντονη τόσο στο κυτταρόπλασμα των εγγύς σωληναριακών κυττάρων όσο και στο κυτταρόπλασμα των άπω σωληναριακών κυττάρων. Σχετικά με την ένταση της έκφρασης είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην IgA νεφροπάθεια και στην μεμβρανώδη σπειραματονεφρίδα. Τέλος, στο νεφρικό ιστό των ασθενών με σπειραματονεφρίδα στα πλαίσια ANCA αγγειίτιδας παρατηρείται πολύ μειωμένη διάχυτη έκφραση και των πρωτεϊνών 14-3-3 και της καλρετικουλίνης. Επιπλέον, ενώ δεν παρατηρείται έκφραση των 14-3-3 πρωτεϊνών και της καλρετικουλίνης με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού στα σπειράματα, όπως φάνηκε και από τη μελέτη με ανοσοϊστοχημεία.

Ανακεφαλαιώνοντας, έχει φανεί από πολλές πρόσφατες μελέτες ότι η παθολογική έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 ή η διαταραχή της αλληλεπίδρασής τους με τους πρωτεϊνικούς τους στόχους συνεισφέρει στην παθογένεια πολλών νοσημάτων, όπως ο καρκίνος, ποικίλες νευρολογικές διαταραχές, νοσήματα του πνεύμονα, αλλά φαίνεται να παίζει και καθοριστικό ρόλο στην δημιουργία και ανάπτυξη της ίνωσης,

όπως για παράδειγμα της νεφρικής ίνωσης. Η ικανότητα αναστρέψιμης ρύθμισης της αλληλεπίδρασης 14-3-3 πρωτεϊνών και πρωτεϊνικού στόχου θα βοηθήσει στην κατανόηση της βιολογίας των πρωτεϊνών αυτών και θα οδηγήσει στη δημιουργία πιθανών θεραπευτικών σκευασμάτων. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 ρυθμίζουν πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια και σημαντικές κυτταρικές διεργασίες. Η στόχευση συγκεκριμένου μορίου σε ένα συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχουν οι 14-3-3 πρωτεΐνες θα ήταν η ιδανική. Περαιτέρω μελέτη και έρευνα απαιτείται ώστε να επιβεβαιωθούν οι πρωτεϊνικοί στόχοι των 14-3-3 πρωτεϊνών ως συμμετέχοντες στην παθογένεια των νοσημάτων (64).

Με την παρούσα μελέτη, υποδεικνύουμε ότι οι 14-3-3 πρωτεΐνες συμμετέχουν στη διεργασία της νεφρικής ίνωσης και μάλιστα από τα αρχικά της στάδια. Προτείνουμε την περαιτέρω μελέτη τους ώστε να επιβεβαιωθεί και να διευκρινιστεί η συμμετοχή τους στη νεφρική ίνωση ώστε να μπορέσει στο μέλλον να αποτελέσει πρώιμη δείκτη της ΧΝΝ όπως επίσης και φαρμακευτικό στόχο ως πιθανός μοριακός μεσολαβητής της νεφρικής ίνωσης.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Goldman L BJ. Cecil Textbook of Medicine. 21st ed: W.B. Saunders; 2000. 1109 p.
2. Gartner LP HJ. Color Textbook of Histology: W.B. Saunders Company; 2001. 621 p.
3. Chronic kidney disease [Medscape]
4. Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, Johnson RJ, Kottgen A, Levey AS, et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*. 2013;382(9887):158-69.
5. O'Toole JF, Sedor JR. Kidney disease: new technologies translate mechanisms to cure. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(6):2294-8.
6. Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clinical immunology*. 2001;99(3):308-19.
7. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):524-9.
8. Edeling M, Ragi G, Huang S, Pavenstadt H, Susztak K. Developmental signalling pathways in renal fibrosis: the roles of Notch, Wnt and Hedgehog. *Nature reviews Nephrology*. 2016;12(7):426-39.
9. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(1):1-12.
10. Farris AB, Colvin RB. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2012;21(3):289-300.
11. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(3):341-50.
12. Grande MT, Perez-Barriocanal F, Lopez-Novoa JM. Role of inflammation in tubulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. *Journal of inflammation*. 2010;7:19.
13. Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nature reviews Nephrology*. 2010;6(11):643-56.
14. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(11):1819-34.

15. Campanholle G, Ligresti G, Gharib SA, Duffield JS. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *American journal of physiology Cell physiology*. 2013;304(7):C591-603.
16. Tampe D, Zeisberg M. Potential approaches to reverse or repair renal fibrosis. *Nature reviews Nephrology*. 2014;10(4):226-37.
17. Chen YT, Chang FC, Wu CF, Chou YH, Hsu HL, Chiang WC, et al. Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis. *Kidney international*. 2011;80(11):1170-81.
18. Duffield JS, Luper M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annual review of pathology*. 2013;8:241-76.
19. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *The New England journal of medicine*. 2008;358(11):1129-36.
20. Lin SL, Chang FC, Schimpf C, Chen YT, Wu CF, Wu VC, et al. Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. *The American journal of pathology*. 2011;178(2):911-23.
21. Wu CF, Chiang WC, Lai CF, Chang FC, Chen YT, Chou YH, et al. Transforming growth factor beta-1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *The American journal of pathology*. 2013;182(1):118-31.
22. Piera-Velazquez S, Mendoza FA, Jimenez SA. Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. *Journal of clinical medicine*. 2016;5(4).
23. Ren S, Johnson BG, Kida Y, Ip C, Davidson KC, Lin SL, et al. LRP-6 is a coreceptor for multiple fibrogenic signaling pathways in pericytes and myofibroblasts that are inhibited by DKK-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(4):1440-5.
24. Yokoi H, Mukoyama M, Nagae T, Mori K, Suganami T, Sawai K, et al. Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(6):1430-40.
25. Hwang I, Seo EY, Ha H. Wnt/beta-catenin signaling: a novel target for therapeutic intervention of fibrotic kidney disease. *Archives of pharmacal research*. 2009;32(12):1653-62.

26. Bowley E, O'Gorman DB, Gan BS. Beta-catenin signaling in fibroproliferative disease. *The Journal of surgical research*. 2007;138(1):141-50.
27. Guo Y, Xiao L, Sun L, Liu F. Wnt/beta-catenin signaling: a promising new target for fibrosis diseases. *Physiological research*. 2012;61(4):337-46.
28. He W, Dai C, Li Y, Zeng G, Monga SP, Liu Y. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(4):765-76.
29. Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(2):212-22.
30. Conway B, Hughes J. Cellular orchestrators of renal fibrosis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2012;105(7):611-5.
31. Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(2):468-74.
32. D'Amico G. The commonest glomerulonephritis in the world: IgA nephropathy. *The Quarterly journal of medicine*. 1987;64(245):709-27.
33. D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome. *Seminars in nephrology*. 2004;24(3):179-96.
34. Alamartine E, Sabatier JC, Guerin C, Berliet JM, Berthoux F. Prognostic factors in mesangial IgA glomerulonephritis: an extensive study with univariate and multivariate analyses. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1991;18(1):12-9.
35. Working Group of the International Ig ANN, the Renal Pathology S, Cattran DC, Coppo R, Cook HT, Feehally J, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney international*. 2009;76(5):534-45.
36. Working Group of the International Ig ANN, the Renal Pathology S, Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney international*. 2009;76(5):546-56.
37. Haas M. Histologic subclassification of IgA nephropathy: a clinicopathologic study of 244 cases. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1997;29(6):829-42.
38. Hogan SL, Muller KE, Jennette JC, Falk RJ. A review of therapeutic studies of idiopathic membranous glomerulopathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1995;25(6):862-75.

39. Wasserstein AG. Membranous glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 1997;8(4):664-74.
40. Ponticelli C, Glassock RJ. Glomerular diseases: membranous nephropathy--a modern view. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 2014;9(3):609-16.
41. Geddes CC, Cattran DC. The treatment of idiopathic membranous nephropathy. *Seminars in nephrology.* 2000;20(3):299-308.
42. Hypertension UKCaDoN. Membranous nephropathy 2016.
43. Schieppati A, Mosconi L, Perna A, Mecca G, Bertani T, Garattini S, et al. Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. *The New England journal of medicine.* 1993;329(2):85-9.
44. Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, Pardo V, Contreras GN. Review: Lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus.* 2010;19(5):557-74.
45. Giannakakis K, Faraggiana T. Histopathology of lupus nephritis. *Clinical reviews in allergy & immunology.* 2011;40(3):170-80.
46. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2004;15(2):241-50.
47. Jennette JC, Falk RJ. Small-vessel vasculitis. *The New England journal of medicine.* 1997;337(21):1512-23.
48. McPhee SJ PM, Rabow MW. *Current Medical Diagnosis and Treatment 51st ed*2012.
49. Aasarod K, Bostad L, Hammerstrom J, Jorstad S, Iversen BM. Renal histopathology and clinical course in 94 patients with Wegener's granulomatosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2001;16(5):953-60.
50. Bajema IM, Hagen EC, Hermans J, Noel LH, Waldherr R, Ferrario F, et al. Kidney biopsy as a predictor for renal outcome in ANCA-associated necrotizing glomerulonephritis. *Kidney international.* 1999;56(5):1751-8.
51. de Lind van Wijngaarden RA, Hauer HA, Wolterbeek R, Jayne DR, Gaskin G, Rasmussen N, et al. Clinical and histologic determinants of renal outcome in ANCA-associated vasculitis: A prospective analysis of 100 patients with severe renal involvement. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2006;17(8):2264-74.
52. Neumann I, Kain R, Regele H, Soleiman A, Kandutsch S, Meisl FT. Histological and clinical predictors of early and late renal outcome in ANCA-



associated vasculitis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2005;20(1):96-104.

53. Berden AE, Ferrario F, Hagen EC, Jayne DR, Jennette JC, Joh K, et al. Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(10):1628-36.

54. Obsil T, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Seminars in cell & developmental biology*. 2011;22(7):663-72.

55. Mhawech P. 14-3-3 proteins--an update. *Cell research*. 2005;15(4):228-36.

56. Aitken A. Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. *Seminars in cell & developmental biology*. 2011;22(7):673-80.

57. Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, Schwartz C, Jaffe H, Namboodiri MA, et al. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(14):8083-8.

58. Muslin AJ, Xing H. 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cellular signalling*. 2000;12(11-12):703-9.

59. Silhan J, Vacha P, Strnadova P, Vecer J, Herman P, Sulc M, et al. 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of forkhead transcription factor FOXO4. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(29):19349-60.

60. Ottmann C, Marco S, Jaspert N, Marcon C, Schauer N, Weyand M, et al. Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H<sup>+</sup> - ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Molecular cell*. 2007;25(3):427-40.

61. Takemaru K, Fischer V, Li FQ. Fine-tuning of nuclear-catenin by Chibby and 14-3-3. *Cell cycle*. 2009;8(2):210-3.

62. Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney international*. 2005;68(3):925-37.

63. Chevallet M, Santoni V, Poinas A, Rouquie D, Fuchs A, Kieffer S, et al. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998;19(11):1901-9.

64. Wilker E, Yaffe MB. 14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;37(3):633-42.

65. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9(9):726-35.

66. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent progress in hormone research*. 2001;56:127-55.
67. Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature*. 1998;395(6703):713-6.
68. Gardino AK, Yaffe MB. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Seminars in cell & developmental biology*. 2011;22(7):688-95.
69. Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *The Journal of cell biology*. 2005;170(2):295-304.
70. Samuel T, Weber HO, Rauch P, Verdoodt B, Eppel JT, McShea A, et al. The G2/M regulator 14-3-3sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(48):45201-6.
71. Tan Y, Demeter MR, Ruan H, Comb MJ. BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(33):25865-9.
72. Berg D, Holzmann C, Riess O. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nature reviews Neuroscience*. 2003;4(9):752-62.
73. Zhao J, Meyerkord CL, Du Y, Khuri FR, Fu H. 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets. *Seminars in cell & developmental biology*. 2011;22(7):705-12.
74. Mavroidis M, Capetanaki Y. Extensive induction of important mediators of fibrosis and dystrophic calcification in desmin-deficient cardiomyopathy. *The American journal of pathology*. 2002;160(3):943-52.
75. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney international*. 2009;75(11):1145-52.
76. Eddy AA, Lopez-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatric nephrology*. 2012;27(8):1233-47.
77. Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, et al. E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:567305.
78. Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *International journal of experimental pathology*. 2011;92(3):158-67.

79. Prakoura N, Politis PK, Ihara Y, Michalak M, Charonis AS. Epithelial calreticulin up-regulation promotes profibrotic responses and tubulointerstitial fibrosis development. *The American journal of pathology*. 2013;183(5):1474-87.
80. Cybulsky AV. Endoplasmic reticulum stress in proteinuric kidney disease. *Kidney international*. 2010;77(3):187-93.