

---

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**

**Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ**

---



**ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΩΝ  
ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΙΣΤΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΣΤΙΣ  
ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΝΕΦΡΙΤΙΔΕΣ**

---

**ΧΑΛΚΙΑ ΑΓΛΑΪΑ**

**ΙΑΤΡΟΣ ΝΕΦΡΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΑΘΗΝΑ 2021

---

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**

**Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ**

---



---

**ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΩΝ  
ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΙΣΤΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΣΤΙΣ  
ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΝΕΦΡΙΤΙΔΕΣ**

---

**ΧΑΛΚΙΑ ΑΓΛΑΪΑ**

**ΙΑΤΡΟΣ ΝΕΦΡΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2021**

Το έργο αυτό διατίθεται με άδεια Creative Commons

Αναφορά Δημιουργού - Μη Εμπορική Χρήση - Παρόμοια Διανομή 4.0 Διεθνές (CC BY-NC-SA)

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

### **1. Γακιοπούλου Χαρίκλεια (Επιβλέπον Μέλος)**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρικής Σχολής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

### **2. Βασιλόπουλος Δημήτριος**

Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας, Β΄ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, Ιατρικής Σχολής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

### **3. Φούκας Περικλής**

Αναπληρωτής Καθηγητής, Β΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρικής Σχολής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Αίτηση υποψήφιας διδάκτορας: 19/12/2017**

**Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 13/02/2018**

**Ορισμός θέματος διδακτορικής διατριβής: 28/3/2018**

**Αλλαγή Επιβλέποντος Καθηγητή: 20/03/2019**

**Κατάθεση διδακτορικής διατριβής: 25/10/2021**

**Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 04/11/2021**

## **Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών**

Γεράσιμος Δ. Σιάσος, Καθηγητής

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

1. Γακιοπούλου Χαρίκλεια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπον Μέλος)
2. Μπολέτης Ιωάννης, Καθηγητής
3. Καβαντζάς Νικόλαος, Καθηγητής
4. Βασιλόπουλος Δημήτριος, Καθηγητής
5. Φούκας Περικλής, Αναπληρωτής Καθηγητής
6. Μαρινάκη Σμαράγδη, Επίκουρη Καθηγήτρια
7. Λιονάκη Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια

**Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: Άριστα**

## ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΩΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΩΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΙΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΙΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΗΣΕΙΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΣΙΩΣΙ ΜΑΘΗΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΗΣΕΙΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΙΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΙΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΣΙΟΙΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΑΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΣΩ, ΣΙΓΗΣΙΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΩΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΣΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΛΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

## ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑ ΚΑΙ Σ' ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΘΕΕΣ, ΠΟΥ ΒΑΣΩ ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΊΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΝΩ ΚΟΙΝΩΝΟ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΦΕΡΩ ΑΠΟ ΤΑ ΔΙΚΑ ΜΟΥ ΟΤΙ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ, ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΞΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ, ΑΝ ΕΠΙΘΥΜΟΥΝ ΝΑ ΜΑΘΟΥΝ ΧΩΡΙΣ ΜΙΣΘΟ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΣΥΜΦΩΝΙΑ, ΟΤΙ ΘΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΤΟΥΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥΣ ΚΑΝΟΝΕΣ, ΤΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΥΠΟΛΟΙΠΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΜΟΥ, ΣΤΟΥΣ ΓΙΟΥΣ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ, ΚΑΙ ΣΕ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΘΑ ΕΧΟΥΝ ΣΥΝΔΕΘΗ ΜΑΖΙ ΜΟΥ ΜΕ ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ, ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ ΤΩΝ ΙΑΤΡΩΝ, ΚΑΙ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ ΑΛΛΟ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ (ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ.

ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΑΡΑΚΛΗΘΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΞΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ. ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΩ ΟΠΩΣΔΗΠΟΤΕ ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΠΑΣΧΟΥΝ ΑΠΟ ΠΕΤΡΑ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΑΦΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ ΣΤΟΥΣ ΕΞΑΣΚΗΜΕΝΟΥΣ, ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΛΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ, Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΝ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ ΣΕ ΣΩΜΑΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ Η ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΞΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΣΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### Προσωπικά Στοιχεία

**Όνοματεπώνυμο:** Χαλκιά Αγλαΐα  
**Ημ. Γέννησης:** 10/07/1987  
**Διεύθυνση:** Αμασειάς 13, ΤΚ 11634, Αθήνα  
**Τηλέφωνο:** 6944419653  
**Email:** aglaia.chalkia@gmail.com

### Βασική Εκπαίδευση-Προπτυχιακή

**2002-2005:** 5ο Ενιαίο Λύκειο Λάρισας, Λάρισα  
Βαθμός απολυτηρίου 19,2/20  
**2005-2011:** Πτυχίο Ιατρικής σχολής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων  
Βαθμός πτυχίου 7,13/10

### Μεταπτυχιακή Εκπαίδευση

**2013-2015:** Ειδικευόμενη ιατρός στην Παθολογία στο Γενικό Νοσοκομείο Τρικάλων  
**2015-2019:** Ειδικευόμενη ιατρός στη Νεφρολογία στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Ιπποκράτειο  
**2017-σήμερα:** Υποψήφια Διδάκτωρ: “ Το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF/ Smad στην παθογένεια των Σπειραματονεφριτίδων” Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή

### Επαγγελματική Εμπειρία

**2012:** Ιατρός Υπόχρεος Υπηρεσίας Υπαίθρου, Κέντρο Υγείας Πάρου  
**2013-2015:** Ειδικευόμενη ιατρός στην Παθολογία στο Γενικό Νοσοκομείο Τρικάλων  
**2015-2019:** Ειδικευόμενη ιατρός στη Νεφρολογία στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Ιπποκράτειο  
**2019-2020:** Ειδικός Νεφρολόγος στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Ιπποκράτειο  
**2020-σήμερα:** Επικουρική Επιμελήτρια Β΄ Νεφρολόγος στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Ιπποκράτειο

### Τίτλος Σπουδών/Άδεια

**8/2011:** Άδεια ασκήσεως Ιατρικού επαγγέλματος, Λάρισα  
**7/2019:** Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας στη Νεφρολογία, Αθήνα

### Εγγραφή σε Επαγγελματικούς Συλλόγους

**2015-σήμερα:** Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών  
**2015-σήμερα:** Ελληνική Νεφρολογική Εταιρεία

- 2016-σήμερα:** Ινστιτούτο Μελέτης, Έρευνας, Εκπαίδευσης και Θεραπείας Νοσημάτων Αγγείων, Καρδιάς, Εγκεφάλου και Νεφρών «I.N.A.K.E.N»
- 2020-σήμερα:** Ευρωπαϊκή Νεφρολογική Εταιρεία (ERA-EDTA)

### **Ξένες Γλώσσες**

- Αγγλικά (C2)  
Certificate of Proficiency in English, University of Michigan
- Γερμανικά (B2)  
Goethe-Zertifikat B2
- Γαλλικά (B2)  
Diplôme d' Études en langue française (Delf) 1er degré B2

### **Κλινική Εμπειρία**

- 2015- τώρα:**
- Κλινική Νεφρολογία και Επείγοντα Περιστατικά
  - Διενέργεια βιοψίας νεφρού με υπέρηχο
  - Τοποθέτηση προσωρινού κεντρικού φλεβικού καθετήρα υπό υπέρηχο
  - Συνταγογράφηση και αξιολόγηση συνεδριών αιμοκάθαρσης και πλασμαφαίρεσης
  - Ιστολογική εξέταση βιοψιών νεφρού σε συνεργασία με την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ Γακιοπούλου Α' Εργαστήριο Παθολογική Ανατομικής Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
  - Παρακολούθηση ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα, ειδικά με ANCA σχετιζόμενη αγγειίτιδα
  - Συμβουλευτική Ιατρική

### **Εκπαιδευτική Δραστηριότητα**

- 2015-σήμερα:** -Συμμετέχω ενεργά σε μαθήματα διδασκαλίας, παρουσιάσεις περιστατικών και ανασκόπησης βιβλιογραφίας από τη Νεφρολογική Κλινική, τη Β' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική και την Α' Πανεπιστημιακή Καρδιολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ΓΝΑ Ιπποκράτειο.
- 2019-σήμερα:** -Συμμετέχω ενεργά σε μαθήματα διδασκαλίας που διοργανώνονται από τη Νεφρολογική Κλινική του ΓΝΑ «Ιπποκράτειο» για το εκπαιδευτικό πρόγραμμα των ειδικευόμενων.
- 2020-σήμερα:** -Συμμετέχω ενεργά σε μαθήματα άσκησης στην αιμοκάθαρση για τους μεταπτυχιακούς φοιτητές στο μεταπτυχιακό “Αρτηριακή Υπέρταση και συνοδά καρδιαγγειακά-νεφρικά νοσήματα” της Ιατρικής Σχολής



Πανεπιστημίου Αθηνών Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
με υπεύθυνο τον Καθηγητή Τσιούφη Κωνσταντίνο.

**2020:** -Συμμετοχή σε εκπαιδευτικά μαθήματα για τη νοσηλευτική ειδικότητα της Παθολογίας στο ΓΝΑ Ιπποκράτειο.

### **Επιστημονική Δραστηριότητα**

**2015-σήμερα:** -Μέλος της ερευνητικής ομάδας μεγάλης κούρτης ασθενών με ANCA-σχετιζόμενη αγγειίτιδα στο ΓΝΑ Ιπποκράτειο (σε συνεργασία με τον Καθηγητή Βασιλόπουλο Δημήτριο, Β΄ Παθολογική Κλινική και Ομώνυμο Εργαστήριο, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

**2018-σήμερα:** -Βασική Έρευνα για το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF/Smad στην παθογένεια των σπειραματονεφριτίδων (θέση Διδάκτορα) (σε συνεργασία με την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ Γακιοπούλου Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

### **Χρηματοδοτούμενα ερευνητικά προγράμματα**

**2017-2019:** -Ενεργός συμμετοχή σε Τυχαιοποιημένη, Φάσης 3 σε ασθενείς με αναιμία σχετιζόμενη με χρόνια νεφρική νόσο που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, (GlaxoSmithKline Research & Development Ltd)

**2018-σήμερα:** -Ενεργός συμμετοχή σε πολυκεντρική μη παρεμβατική μελέτη για την παρακολούθηση της επίπτωσης των παρενεργειών και της έλλειψης αποτελεσματικότητας ανάμεσα σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο που λαμβάνουν υποδόρια Binocrit ή Epoetin Alfa Hexal. (Hexal AG)

**2021:** -Ενεργός συμμετοχή σε Τυχαιοποιημένη, Φάσης 2b για την αξιολόγηση της ασφάλειας της δόσης osocimab σε ασθενείς με ΧΝΝΤΣ (Bayer)

**2021:** -Ενεργός συμμετοχή σε Τυχαιοποιημένη Φάσης 3 για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας και ασφάλειας της φινερενόνης, στην εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής νόσου σε ασθενείς με μη-διαβητική χρόνια νεφρική νόσο (Bayer)

### Πλήρεις Δημοσιεύσεις σε διεθνή και ελληνικά περιοδικά

1. **Chalkia A**, Gakiopoulou H, Theohari I, Foukas PG, Vassilopoulos D, Petras D. Transforming Growth Factor-β1/Smad Signaling in Glomerulonephritis and Its Association with Progression to Chronic Kidney Disease. **Am J Nephrol**. 2021 Sep 8:1-13
2. **Chalkia A**, Gakiopoulou H, Theohari I, Foukas PG, Vassilopoulos D, Petras D. TGF-β1/Smad signaling in proliferative glomerulonephritis associated with autoimmune diseases. **MJR** 2021 (accepted for publication)
3. **Chalkia A**, Thomas K, Giannou P, Panagiotopoulos A, Hadziyannis E, Kapota A, Gakiopoulou H, Vassilopoulos D, Petras D. Hypocomplementemia is associated with more severe renal disease and worse renal outcomes in patients with ANCA-associated vasculitis: a retrospective cohort study. **Ren Fail**. 2020; 42(1): 845–852
4. Thomas K, Argyriou E, Kapsala N, Panagiotopoulos A, **Chalkia A**, Hadziyannis E, Boki K, Katsimbri P, Boumpas DT, Giannou P, Petras D, Vassilopoulos D. Serious infections in ANCA-associated vasculitides in the biologic era: Real life data from a multicenter cohort of 162 patients. **Arthritis Res Ther** 2021 Mar 20;23(1):90
5. Alexakou Z, Kourniotis D, Mpora M, Aggelis G, Damianaki A, **Chalkia A**, Kapota A, Tsalapaki C, Giannou P, Vasilopoulos D, Petras D. Relapsing MPO Positive Vasculitis with Lung Hemorrhage in a Patient on Hemodialysis. **J Urol Ren Dis** 2020 05: 1184.
6. **Chalkia A**, Alexakou Z, Kourniotis D, Mpora M, Gakiopoulou H, Petras D. Fibrillary glomerulonephritis with atypical IgM deposits and hypocomplementemia revealed HIV infection. **Saudi J Kidney Dis Transpl**. (accepted for publication)
7. **Chalkia A**, Giannou P, Thomas K, Vassilopoulos D, Petras D. Distal renal tubular acidosis and nephrocalcinosis as initial manifestation of primary Sjögren's syndrome. **Saudi J Kidney Dis Transpl**. (accepted for publication)
8. **Χαλκιά Α**, Πετράς Δ. Οξεία Νεφρική Βλάβη σχετιζόμενη με Οξεία Διάμεση Νεφρίτιδα. **Περιοδικό Ελληνικής Νεφρολογικής Εταιρείας** Vol 32, No 3 (2020)

### Δημοσιεύσεις υπό τη μορφή περιλήψεων σε διεθνή περιοδικά

1. **Chalkia A**, Gakiopoulou H, Giannou P, Alexakou Z, Kapota A, Kourniotis D, Petras DI. TGF-β1/Smad signaling in glomerulonephritis and its association with progression to chronic kidney disease. **JASN Kidney Week Abstract Sup**. 2021
2. **Chalkia A**, Kapota A, Agelis G, Mpora M, Kourniotis D, Alexakou Z, Damianaki K, Petras D. Acute kidney injury associated with anticoagulant-related nephropathy in a newly diagnosed IgA nephropathy **JASN Kidney Week Abstract Sup**. 2021
3. **Chalkia A**, Thomas K, Giannou P, Panagiotopoulos A, Hadziyannis E, Kapota A, Gakiopoulou H, Vassilopoulos D, Petras D. Evaluation of serum C3 levels and C3 immunofluorescence in patients with ANCA-associated vasculitis: A retrospective cohort study. **NDT Abstract Sup**, 2021
4. **Chalkia A**, Thomas K, Kourniotis D, Panagiotopoulos A, Alexakou Z, Mpora M, Aggelis G, Vassilopoulos D, Petras D. Long-term maintenance treatment with Rituximab in ANCA - associated Vasculitis: A retrospective cohort study. **NDT Abstract Sup**, 2021
5. **Chalkia A**, Thomas K, Giannou P, Alexakou Z, Kapota A, Tsalapaki C, Vassilopoulos D, Petras D. Hypocomplementemia is associated with more severe renal disease and worse renal outcomes in patients with ANCA-associated vasculitis: A retrospective cohort study. **JASN Kidney Week Abstract Sup**. 2020

6. **Chalkia A**, Giannou P, Damianaki K, Thomas K, Tsalapaki C, Vassilopoulos D, Petras D. Role of therapeutic plasmapheresis in ANCA-associated vasculitis: A single-center study. **JASN Kidney Week Abstract Sup. 2020**
7. **Chalkia A**, Giannou P, Damianaki K, Thomas K, Tsalapaki C, Vassilopoulos D, Petras D. Role of therapeutic plasmapheresis in ANCA-associated vasculitis: A single-center study. **NDT Abstract Sup, 2020**
8. Kapota A, Damianaki K, Giannou P, **Chalkia A**, Mpougatsos G, Petras D. Icodextrin-induced chemical peritonitis in a patient with cardiorenal syndrome. **NDT Abstract Sup, 2020**
9. Thomas K, **Chalkia A**, Drekolias D, Tsalapaki C, Lazarini A, Klaudianou K, Antonatou K, Makris A, Hatzara C, Hadziyannis E, Kouki P, Petras D, Vassilopoulos D. Incidence of serious infections and patterns of cotrimoxazole prophylaxis in patients with ANCA-associated vasculitides. **Annals of the Rheumatic Diseases. 2019**
10. **Chalkia A**, Thomas K, Kapota A, Kouki P, Vassilopoulos D, Petras D. Incidence and risk factors of serious infections in ANCA-associated vasculitis with renal involvement. **JASN Kidney Week Abstract Sup. 2019**
11. Kouki P, Damianaki K, **Chalkia A**, Giannou P, Gakiopoulou H, Vassilopoulos D, Petras D. Evaluation of the Full-house immunofluorescence pattern (FH) in patients without systemic lupus erythematosus (SLE): A single centre observation study. **JASN Kidney Week Abstract Sup. 2018**
12. Damianaki K, Dimitriadis K, Alexakou Z, **Chalkia A**, Tsioufis K, Petras D. Renal functional reserve mirrors the sympathetic overdrive influence on the heart. **JASN Kidney Week Abstract Sup. 2018**
13. Giannou P, Kapota A, Magkas N, Feretou K, **Chalkia A**, Petras D. The efficacy of hemodialysis in preventing contrast-induced nephropathy in patients with pre-existing renal insufficiency: A single center experience. **JASN Kidney Week Abstract Sup. 2017**
14. Damianaki K, Dimitriadis K, **Chalkia A**, Tsioufis K, Petras D. Renal functional reserve is related to exercise heart rate in essential hypertensive patients. A novel link between the kidneys and the heart. **JASN Kidney Week Abstract Sup. 2017**
15. Giannou P, Thomas K, **Chalkia A**, Damianaki K, Vassilopoulos D, Petras D. Efficacy and safety of Rituximab in patients with ANCA-associated vasculitis and renal disease in clinical practice. **JASN Kidney Week Abstract Sup. 2016**
16. Giannou P, Kapota A, Damianaki K, **Chalkia A**, Petras D. On-line Hemodiafiltration: Which mode for better cost effectiveness. **JASN Kidney Week Abstract Sup. 2016**

### **Επιστημονικός Κριτής Περιοδικών**

Clinical Rheumatology (2021)

Saudi Journal of Kidney Disease and Transplantation (2020-2021)

### **Προφορικές Ανακοινώσεις/Ομιλίες σε ελληνικά συνέδρια**

1. **Χαλκιά Α.** Μηχανισμοί Ινωσης στη σπειραματονεφρίτιδα σχετιζόμενη με αγγειίτιδες. **7<sup>η</sup> Διημερίδα με Θέμα: Αγγειίτιδες, Αθήνα Σεπ 24-25**
2. **Χαλκιά Α.**, Γακιοπούλου Χ., Κουρνώτης Δ., Αλεξάκου Ζ., Βασιλόπουλος Δ., Πετράς Δ. Το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF/Smad στην ANCA σχετιζόμενη σπειραματονεφρίτιδα. **7<sup>η</sup> Διημερίδα με Θέμα: Αγγειίτιδες, Αθήνα Σεπ 24-25**
3. Μαυρέα Ε. \*, **Χαλκιά Α.** \*, Κουτσιανός Χ., Παναγιωτόπουλος Α., Γιάννου Π., Θωμάς Κ.,

- Αλεξάκου Ζ., Αντωνάτου Κ., Πετράς Δ. , Βασιλόπουλος Δ. Δεδομένα εμβολιασμού ασθενών με ANCA Αγγεΐτιδες έναντι Sars-Cov-2: η άποψη των ασθενών. **7<sup>η</sup> Δημερίδα με Θέμα: Αγγεΐτιδες, Αθήνα Σεπ 24-25** \*ισότιμη συνεισφορά
4. Παναγιωτόπουλος Α. , Θωμάς Κ. , Αργυρίου Ε., Καψάλα Ν., Χαλκιά Α. , Μαυρέα Ε. , Πετράς Δ., Μπούμπας Δ., Βασιλόπουλος Δ. Συγχρονική, συγκριτική μελέτη ποιότητας ζωής ασθενών με ANCA αγγεΐτιδες και ρευματοειδή αρθρίτιδα. **7<sup>η</sup> Δημερίδα με Θέμα: Αγγεΐτιδες, Αθήνα Σεπ 24-25**
  5. Χαλκιά Α. Οξεία νεφρική βλάβη και διάμεση νεφροπάθεια . **Acute Kidney Injury Meeting 2021. Αθήνα 17-18 Σεπ**
  6. Θωμάς Κ, Αργυρίου Ε, Καψάλα Ν, Παναγιωτόπουλος Α, Χαλκιά Α, Χατζηγιάννη Ε, Μποκή Κ, Κατσιμπρή Π, Μπούμπας Δ, Γιάννου Π, Πετράς Δ, Βασιλόπουλος Δ. Πολυκεντρική μελέτη καταγραφής των σοβαρών λοιμώξεων σε ασθενείς με ANCA-σχετιζόμενες αγγεΐτιδες: Δεδομένα από 162 ασθενείς. **27<sup>ο</sup> Πανελλήνιο συνέδριο Ρευματολογίας, 10-13 Δεκεμβρίου 2020, 1ο βραβείο ΕΡΕ-ΕΠΕΡΕ**
  7. Χαλκιά Α. Θωμάς Κ, Μπόρα Μ, Παναγιωτόπουλος Α, Αλεξάκου Ζ, Κουρνώτης Δ, Αγγελής Γ, Βασιλόπουλος Δ, Πετράς Δ. Μακροχρόνια Χορήγηση Rituximab ως θεραπεία συντήρησης σε ασθενείς με ANCA-σχετιζόμενη αγγεΐτιδα. **6<sup>η</sup> Δημερίδα με Θέμα: Αγγεΐτιδες, Αθήνα Σεπ 18-19, 2020**
  8. Χαλκιά Α. Θωμάς Κ, Γιάννου Π, Παναγιωτόπουλος Α, Ε. Χατζηγιάννη, Καποτά Α, Βασιλόπουλος Δ, Πετράς Δ. Η υποσυπληρωματιναιμία σχετίζεται με πιο σοβαρή νεφρική νόσο και χειρότερη νεφρική πρόγνωση σε ασθενείς με ANCA-σχετιζόμενη αγγεΐτιδα: Αναδρομική μελέτη ενός κέντρου. **6<sup>η</sup> Δημερίδα με Θέμα: Αγγεΐτιδες, Αθήνα Σεπ 18-19, 2020**
  9. Χαλκιά Α. Θωμάς Κ, Καποτά Α, Κούκη Π, Πετράς Δ. Συχνότητα και παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση σοβαρών λοιμώξεων σε ασθενείς με ANCA σχετιζόμενη αγγεΐτιδα και νεφρική προσβολή. **21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Δελφοί, Μάιος 29-Ιούνιος 1,2019**
  10. Χαλκιά Α. Θωμάς Κ, Γιάννου Π, Καποτά Α, Τσαλαπακη Χ, Αντωνάτου Κ, Κούκη Π, Βασιλόπουλος Δ, Πετράς Δ. Ο ρόλος της πλασμαφαίρεσης σε ANCA σχετιζόμενη αγγεΐτιδα: Εμπειρία ενός κέντρου. **5<sup>η</sup> Δημερίδα με Θέμα: Αγγεΐτιδες, Αθήνα Σεπ 27-29, 2019**
  11. Χαλκιά Α. Παρουσίαση Περιστατικού. **Acute Kidney Injury meeting 2018, 24 Feb, Athens**
  12. Χαλκιά Α. Αλεξάκου Ζ, Καποτά Α, Δαμιανάκη Κ, Κούκη Π, Πετράς Δ. Χαρακτηριστικά και Πρόγνωση σε ενήλικες με IgA αγγεΐτιδα με νεφρική προσβολή. **4<sup>η</sup> Δημερίδα με Θέμα: Αγγεΐτιδες, Αθήνα, Σεπ 28-29, 2018**
  13. Χαλκιά Α. Παρουσίαση Περιστατικού. **3<sup>η</sup> Δημερίδα με Θέμα: Αγγεΐτιδες, Αθήνα Σεπ 29-30, 2017**
  14. Δαμιανάκη Κ, Γιάννου Π, Χαλκιά Α. Καποτά Α, Πετράς Δ. On-line αιμοδιαδιήθηση: Χορήγηση υγρού αντικατάστασης πριν ή μετά το φίλτρο? **94<sup>η</sup> Επιστημονική Συνάντηση Ελληνικής Νεφρολογικής Εταιρείας, Νοέμβριος 16-18, 2017**
  15. Χαλκιά Α. Παρουσίαση Περιστατικού. **Δεύτερο Σχολείο του Ερυθρηματώδους Λύκου (ΣΕΛ), Αθήνα, Δεκ 1-2, 2017**
  16. Γιάννου Π, Δαμιανάκη Κ, Χαλκιά Α. Καποτά Α, Λάζαρος Γ, Πετράς Δ. Η οξεία νεφρική βλάβη και η ενδονοσοκομειακή μεταβολή των επιπέδων ουρικού οξέος προβλέπουν συνεργικά την πρόωμη θνητότητα σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. **19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Καλαμάτα, Μάιος 11-14, 2016**
  17. Γιάννου Π, Θωμάς Κ, Δαμιανάκη Κ, Χαλκιά Α. Βασιλόπουλος Δ, Πετράς Δ. Η

αποτελεσματικότητα του Rituximab σε ασθενείς με ANCA αγγειίτιδα και νεφρική προσβολή. **19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Καλαμάτα, Μάιος 11-14, 2016**

#### **Αναρτημένες Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια**

1. **Χαλκιά Α**, Γιάννου Π, Θωμάς Κ, Καποτά Α, Παναγιωτόπουλος Α, Κούκη Π, Βασιλόπουλος Δ, Πετράς Δ. Ο ρόλος της πλασμαφαίρεσης σε ANCA-σχετιζόμενη αγγειίτιδα με νεφρική προσβολή: Εμπειρία ενός κέντρου. **22<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Θεσσαλονίκη, 13-16 Μαΐου, 2021**
2. **Χαλκιά Α**, Γιάννου Π, Θωμάς Κ, Δαμιανάκη Κ, Τσαλαπάκη Χ, Γακιοπούλου Χ, Βασιλόπουλος Δ, Πετράς Δ. Κλινικά χαρακτηριστικά και πρόγνωση ασθενών με ANCA-σχετιζόμενες αγγειίτιδες και χαμηλά επίπεδα συμπληρώματος. **22<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Θεσσαλονίκη, 13-16 Μαΐου, 2021**
3. **Χαλκιά Α**, Δαμιανάκη Κ, Θωμάς Κ, Κούκη Π, Βασιλόπουλος Δ, Πετράς Δ. Χαρακτηριστικά και Πρόγνωση σε ενήλικες με IgA αγγειίτιδα με νεφρική προσβολή. **21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Δελφοί, Μάιος 29-Ιούνιος 1,2019**
4. Δαμιανάκη Κ, **Χαλκιά Α**, Καποτά Α, Κούκη Π, Τσαλαπάκη Χ, Βασιλόπουλος Δ, Πετράς Δ. Ιδιοπαθής full-house νεφροπάθεια σε ασθενή χωρίς Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (παρουσίαση περιστατικού) **21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Δελφοί, Μάιος 29-Ιούνιος 1, 2019**
5. Γιάννου Π, Αγγελής Α, Καποτά Α, **Χαλκιά Α**, Αγγελή Κ, Πετρά Δ. Ο ρόλος της μεσογειακής διατροφής στην αθηρωμάτωση και ρεολογία περιφερικών αγγείων σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου υπό αιμοκάθαρση και υπό περιτοναϊκή εξωνεφρική κάθαρση. **21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Δελφοί, Μάιος 29-Ιούνιος 1,2019**
6. Θωμάς Κ, **Χαλκιά Α**, Δρεκόλιας Δ, Τσαλαπάκη Χ, Λαζαρίνη Α, Κλαυδιανού Κ, Αντωνάτου Κ, Μακρή Α, Χατζάρα Χ, Χατζηγιάννη Α, Κούκη Π, Πετράς Δ, Βασιλόπουλος Δ. Συχνές Λοιμώξεις σε ασθενείς με ANCA-σχετιζόμενες αγγειίτιδες, εμπειρία ενός κέντρου **26<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας, Αθήνα, Δεκ 6-9, 2018**
7. Δαμιανάκη Κ, Κούκη Π, Γιάννου Π, **Χαλκιά Α**, Γακιοπούλου Χ, Βασιλόπουλος Δ, Πετράς Δ. Η αξιολόγηση του Full-House προτύπου στον ανοσοφθορισμό (FH) σε ασθενείς χωρίς νεφρίτιδα του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου (ΣΕΛ). **20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Αθήνα, Μάιος 3-6, 2018**
8. Δαμιανάκη Κ, Δημητριάδης Κ, Γιάννου Π, **Χαλκιά Α**, Καποτά Α, Τσιούφης Κ, Πετράς Δ. Οι λειτουργικές νεφρικές εφεδρείες και η συσχέτιση τους με τη δοκιμασία κόπωσης σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση. **20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Αθήνα, Μάιος 3-6, 2018**
9. Γιάννου Π, Κακκιούζη Β, **Χαλκιά Α**, Κούκη Π, Αγγέλη Κ, Πετράς Δ. Η μελέτη παραμόρφωσης στην διάκριση διαφορών της μυοκαρδιακής λειτουργίας του σε ασθενείς με τελικού σταδίου χρόνιας νεφρικής νόσου. **19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Καλαμάτα, Μάιος 11-14, 2016**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Χωρίς την παρουσία, την υποστήριξη και την ανεκτικότητα κάποιων ανθρώπων δε θα ήταν δυνατή η υλοποίηση της.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα αρχικά να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Επιβλέπουσα **Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Χαρίκλεια Γακιοπούλου** για τη διαρκή επιστημονική καθοδήγηση, για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε κάθε πτυχή της πολυετούς πλέον συνεργασίας μας και την τιμή που μου έκανε αναθέτοντας το έργο αυτό, για τις πολύτιμες ευκαιρίες που μου πρόσφερε στους τομείς της έρευνας, για την ελευθερία και τέλος για το σεβασμό που επέδειξε στις ερευνητικές επιλογές μου. Η συνεργασία μας αποτελεί πρότυπο υγιούς και άρτιας επιστημονικά καταρτισμένης συνεργασίας.

Ακολούθως, θα ήθελα να εκφράσω τα ολόθερμα ευχαριστώ και την ευγνωμοσύνη μου στον **Καθηγητή Δημήτριο Βασιλόπουλο** για την τιμή που μου έκανε να με έχει συνεργάτη του από τα πρώτα βήματα της επιστημονικής μου καριέρας. Με την άριστη επιστημονική του κατάρτιση, το ήθος του, το συνεχές ενδιαφέρον για την πρόοδο της διατριβής μου και την προθυμία του για συζήτηση με καθοδήγησε σε όλα τα στάδια της έρευνας. Το παρόν εγχείρημα δεν θα ήταν εφικτό χωρίς τις προτάσεις του και τις πολύτιμες ευκαιρίες που μου πρόσφερε. Θα αποτελεί πάντα για μένα αληθινό πρότυπο ήθους και επιστήμονα.

Τον **Αναπληρωτή Καθηγητή Περικλή Φούκα** ευχαριστώ θερμά που δέχθηκε πρόθυμα να αποτελέσει μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου και που πάντα με στήριζε και με καθοδηγούσε, ιδιαίτερα τον πρώτο χρόνο ως Επιβλέπων Καθηγητής.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις απεριόριστες ευχαριστίες μου στο **Δημήτριο Πετρά,** **Συντονιστή Διευθυντή του Νεφρολογικού Τμήματος του ΓΝΑ «Ιπποκράτειο»** για την πολύτιμη καθοδήγηση και τις σημαντικές ευκαιρίες που μου πρόσφερε από τα πρώτα χρόνια της ειδικότητας μου στη Νεφρολογία, αλλά και συνεχίζει να μου προσφέρει. Με την άριστη

επιστημονική κατάρτιση, τη διορατικότητα, την κριτική σκέψη, την αποφασιστικότητα και την αρτιότητα του χαρακτήρα, αποτελεί τον μέντορα μου στο δρόμο της Νεφρολογίας. Επιπλέον, τον ευχαριστώ θερμά καθώς χωρίς την στήριξη του δε θα ήταν δυνατή η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής.

Την τεχνολόγο του Α΄ Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών **Ειρήνη Θεοχάρι** για την ουσιαστική βοήθεια της στην ανοσοϊστοχημική επεξεργασία των τομών.

Τελειώνοντας, σε μια πράξη ευγνωμοσύνης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους **γονείς μου** Χρυσούλα Βαθράκη και Ευάγγελο Χαλκιά για την οικονομική και ηθική στήριξη που μου παρείχαν στη ζωή μου.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**



## A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.	Στοιχεία Ανατομίας- Ιστολογίας Νεφρού.....	20
1.1.	Νεφρικό σωματίο.....	22
1.2.	Νεφρικό σωληνάριο.....	26
1.3.	Διάμεσος ιστός.....	28
1.4.	Νεφρική αιμάτωση.....	30
2.	Στοιχεία Φυσιολογίας Νεφρού.....	31
3.	Σπειραματονεφρίτιδες-Γενικά χαρακτηριστικά.....	34
3.1.	Ιστορικό-Φυσική εξέταση.....	34
3.2.	Κλινικές εκδηλώσεις.....	35
3.3.	Εργαστηριακός έλεγχος.....	36
3.4.	Βιοψία νεφρού.....	37
4.	Ιστολογική ταξινόμηση σπειραματικών παθήσεων.....	45
4.1.	Απουσία αλλοιώσεων στο οπτικό μικροσκόπιο.....	45
4.1.1	Νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων.....	45
4.2.	Πάχυνση βασικών μεμβρανών χωρίς κυτταροβρίθεια ή μεσαγγειακή υπερπλασία.....	46
4.2.1	Μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια.....	46
4.3.	Πάχυνση των βασικών μεμβρανών με μεσαγγειακή υπερπλασία με λίγη ή/χωρίς κυτταροβρίθεια.....	48
4.4.	Εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση χωρίς κυτταροβρίθεια.....	48
4.4.1.	Εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση.....	48
4.5.	Μεσαγγειακή υπερπλασία.....	49
4.5.1	IgA νεφροπάθεια.....	49
4.6.	Πάχυνση βασικών μεμβρανών με κυτταροβρίθεια.....	50
4.6.1	Μεμβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα.....	51
4.6.2	Σπειραματονεφρίτιδα σχετιζόμενη με τον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο.....	51
4.7.	Εξωτριχοειδής υπερπλασία.....	52
4.7.1	ANCA-σχετιζόμενη σπειραματονεφρίτιδα.....	52
5.	Μηχανισμοί σπειραματικής βλάβης.....	54

5.1.	Χυμική ανοσία.....	54
5.2.	Κυτταρική ανοσία.....	56
5.3.	Ανοσολογικοί μηχανισμοί.....	56
	5.3.1 Σημασία της σπειραματικής βλάβης.....	57
	5.3.2. Φλεγμονώδεις Μηχανισμοί της Σπειραματικής Βλάβης.....	59
	5.3.3 Μη φλεγμονώδης Σπειραματική Βλάβη.....	69
5.4.	Παθογενετικοί παράγοντες ανοσολογικής αρχής σε ποδοκυττοπάθειες.....	69
6.	Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των TGF-β/Smad.....	75
7.	Ρόλος του TGF-β στην παθογένεια της νεφρικής βλάβης.....	80
	7.1 Νεφρική Ίνωση.....	81
	7.2 Νεφρική Φλεγμονή.....	82
	7.3 TGF-β σηματοδοτικό μονοπάτι και φλεγμονώδη κύτταρα.....	83
	7.3.1 T κύτταρα.....	83
	7.3.2 B κύτταρα.....	83
	7.3.3 Μακροφάγα.....	83
	7.3.4 Αιμοπετάλια.....	85
	7.3.5 Ουδετερόφιλα.....	84
	7.3.6 Δενδριτικά.....	84
	7.4 TGF-β σηματοδοτικό μονοπάτι και ενδογενή νεφρικά κύτταρα .....	85
	7.4.1 Μεσαγγειακά κύτταρα.....	85
	7.4.2 Επιθηλιακά (ποδοκύτταρα) κύτταρα.....	85
	7.4.3 Ενδοθηλιακά κύτταρα.....	85
	7.4.4 Σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα.....	86
	7.4.5 Κύτταρα τύπου ινοβλαστών.....	86
8.	Ρόλος του TGF-β/Smad σηματοδοτικού μονοπατιού στη διαμεσολάβηση της νεφρικής βλάβης-πειραματικά μοντέλα και στον άνθρωπο.....	87
	8.1 Ο ρόλος του TGF-β1 στη διαμεσολάβηση της νεφρικής βλάβης.....	89
	8.2 Ο ρόλος της Smad3 στη διαμεσολάβηση της νεφρικής βλάβης.....	90
	8.3 Ο ρόλος της Smad7 στη διαμεσολάβηση της νεφρικής βλάβης.....	91

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

1. Εισαγωγή.....	93
2. Σκοπός παρούσας μελέτης.....	95
3. Υλικό.....	96
4. Κλινοεργαστηριακά Χαρακτηριστικά.....	97
5. Μέθοδοι.....	99
5.1. Βιοψίες Νεφρού.....	99
5.2. Τεχνική Ανοσοϊστοχημείας.....	100
5.3 Αντισώματα.....	102
5.4. Εκτίμηση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης.....	103
5.5 Ψηφιακή Μέθοδος Ανάλυσης και Επεξεργασίας Εικόνας (Image Analysis).....	105
6. Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....	105
7. Αποτελέσματα.....	106
7.1 Κλινικά και Εργαστηριακά στοιχεία.....	106
7.2 Βιοψία Νεφρού – Ιστολογικά Ευρήματα.....	109
7.3 Εκφραση των TGF-β1, pSmad, Smad7 στο φυσιολογικό νεφρό.....	111
7.4 Εκφραση των TGF-β1, pSmad, Smad7 στις πειραματικές παθήσεις.....	115
7.4.1 IgA νεφροπάθεια.....	115
7.4.2 Μεμβρανώδης Σπειραματοπάθεια.....	118
7.4.3 Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση - Νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων.....	122
7.4.4 ANCA-σχετιζόμενη σπειρατονεφρίτιδα.....	127
7.4.5 Σπειρατονεφρίτιδα σχετιζόμενη με τον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο.....	131
7.5 Συσχετίσεις μεταξύ των TGF-β1, pSmad3, Smad7 με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους.....	135
7.6 Η έκφραση των TGF-β1, pSmad3 και Smad7 συγκριτικά ανάμεσα στους μάρτυρες και στις διάφορες σπειρατονεφρίτιδες.....	136
7.7 Η ισορροπία των TGF-β1, pSmad3, Smad7 και ποσοτικά πρότυπα έκφρασης στο σπείραμα.....	141
7.8 Εξέλιξη στη χρόνια νεφρική νόσο.....	142

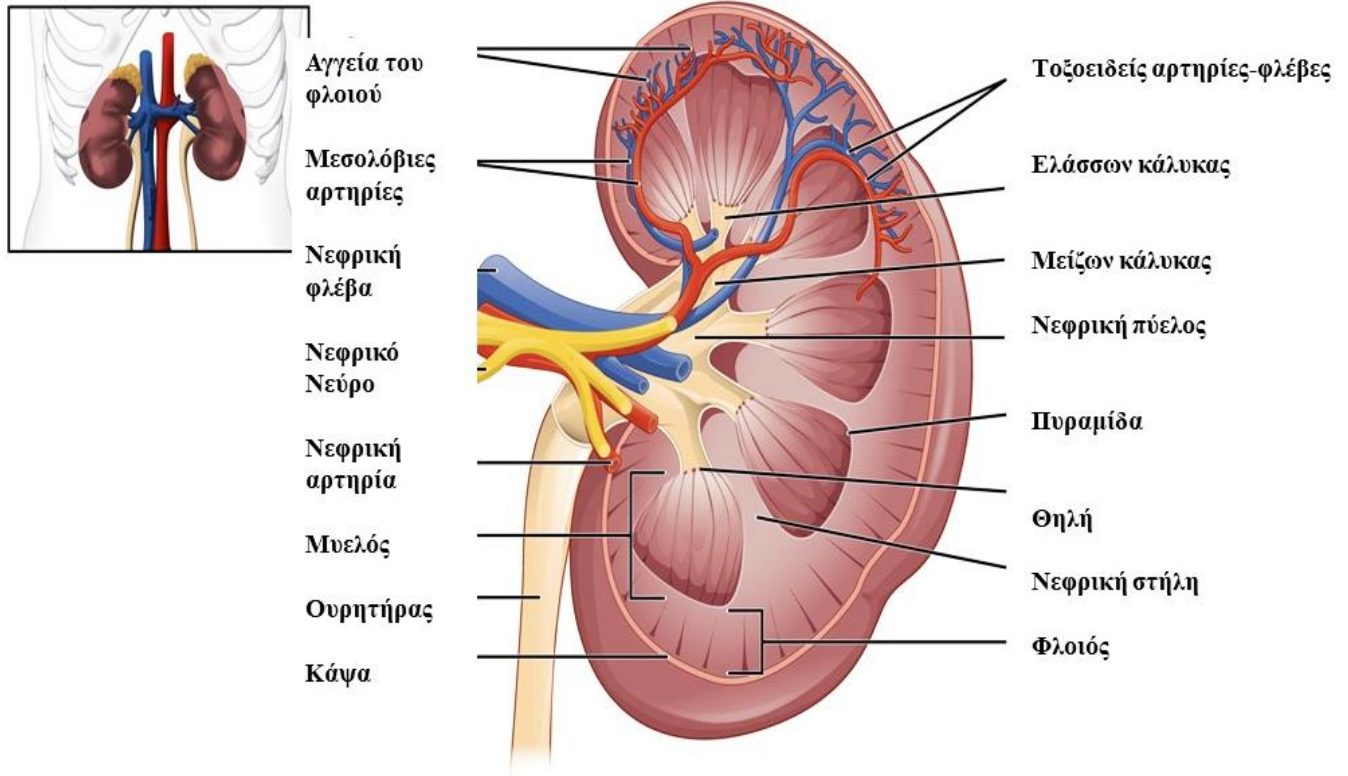
7.9	Εξέλιξη σε χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου.....	145
8.	Συζήτηση.....	146
9.	Συμπεράσματα/Προοπτικές.....	150
10.	Δημοσιεύσεις.....	152
11.	Περίληψη στην ελληνική γλώσσα.....	153
12.	Περίληψη στη αγγλική γλώσσα.....	155
13.	Συνομογραφίες.....	157
14.	Βιβλιογραφία.....	159

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΝΕΦΡΟΥ

Οι νεφροί κείνται οπισθοπεριτοναϊκά στην οσφυϊκή χώρα, εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης στο ύψος του 12<sup>ου</sup> θωρακικού - μέχρι του 3<sup>ου</sup> οσφυϊκού σπονδύλου. Ο νεφρός του ενήλικα έχει βάρος μεταξύ 115-170 g και μέγεθος 11x6x2.5cm (μήκος - πλάτος - πάχος). Το βάρος του νεφρού σχετίζεται με την επιφάνεια του σώματος. Ο αριστερός νεφρός είναι συνήθως μεγαλύτερος του δεξιού, αλλά και οι δύο περιβάλλονται από απαστράπτουσα σκληρή περιτονία. Ο μυελός διαιρείται σε 8 - 18 κωνικές λωρίδες, τις επονομαζόμενες πυραμίδες. Οι βάσεις των πυραμίδων φτάνουν μέχρι τη συνοριακή περιοχή του φλοιού με το μυελό. Η κορυφή κατευθύνεται προς την πύελο στην οποία εισέρχεται σχηματίζοντας τις νεφρικές θηλές. Γειτονικές νεφρικές θηλές ενώνονται και σχηματίζουν τους ελάσσονες κάλυκες, που με τη σειρά τους δημιουργούν τους τρεις μείζονες κάλυκες. Τέλος, η συνένωση των τριών μείζονων καλύκων, σχηματίζει τη νεφρική πύελο. Η κορυφή κάθε θηλής διαθέτει μικρές οπές, οι οποίες σχηματίζουν το απώτερο τέλος των αθροιστικών σωληναρίων. Ο φλοιός επεκτείνεται και καταλαμβάνει τους χώρους μεταξύ των πυραμίδων, σχηματίζοντας τις στήλες του Bertini. Οι στήλες αυτές είναι προσεκβολές του νεφρικού φλοιού που φτάνουν μέχρι της νεφρικής πυέλου [1,2].

Το νεφρικό παρέγχυμα αποτελείται από τους νεφρώνες, τα αθροιστικά σωληνάκια και ένα εκτεταμένο δίκτυο τριχοειδών. Ο κάθε νεφρός περιέχει κατά προσέγγιση ένα εκατομμύριο νεφρώνες, οι οποίοι αποτελούν την μικρότερη ανεξάρτητη ανατομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού. Ο αριθμός αυτός έχει ήδη καθοριστεί προγεννητικά, ενώ μετά τη γέννηση δε σχηματίζονται νέοι νεφρώνες και δεν είναι δυνατή η αντικατάσταση τυχόν κατεστραμμένων. Σε εγκάρσια διατομή το παρέγχυμα διαιρείται σε 2 ζώνες: εξωτερικά τη φλοιώδη και εσωτερικά τη μυελώδη μοίρα. Η μυελώδης μοίρα αποτελείται αρχικά από αρκετούς νεφρικούς λοβούς, κάθε ένας από τους οποίους σχηματίζει μια πυραμίδα. Οι κορυφές των πυραμίδων, καλούμενες νεφρικές θηλές, προβάλλουν μέσα στη νεφρική κοιλία.



**Εικόνα 1.** Ανατομία νεφρού (τροποποιημένο από:

<https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/25-1-internal-and-external-anatomy-of-the-kidney/>)

Ο νεφρώνας αποτελείται από το **νεφρικό σωμάτιο ή σωμάτιο του Bowman** και από ένα **σωληναριακό τμήμα** που ξεκινά από το νεφρικό σωμάτιο. Το νεφρικό σωμάτιο αποτελείται από το **σπείραμα** και ένα επιθηλιακό έλυτρο **την κάψα Bowman**. Τα νεφρικά σωμάτια βρίσκονται αποκλειστικά στο νεφρικό φλοιό και προσδίδουν σε αυτόν τη χαρακτηριστική κοκκώδη εμφάνιση του. Το σωληναριακό τμήμα αποτελείται από το **εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο** (σωληνάριο Α τάξης), την **αγκύλη του Henle**, με το ανιόν και το κατιόν σκέλος της, το **άπω εσπειραμένο σωληνάριο** (σωληνάριο Β τάξης) και το **αθροιστικό σωληνάριο**. Σε κάθε αθροιστικό σωληνάριο εκβάλλουν περισσότεροι από ένας νεφρώνες μέσω του **συνδετικού σωληναρίου** που αποτελεί επέκταση του άπω εσπειραμένου σωληναρίου. Γειτονικά αθροιστικά σωληνάρια στη συνέχεια συναθροίζονται και εκβάλλουν στις νεφρικές θηλές. [1-3]

Ανάλογα με τη θέση των νεφρικών σωματίων στο φλοιό διακρίνονται τρεις κατηγορίες νεφρώνων:

- 1) **Επιφανειακοί φλοιώδεις νεφρώνες:** στην περίπτωση αυτή τα νεφρικά σωματίδια βρίσκονται εξωτερικά (προς τη νεφρική κάψα)
- 2) **Μεσοφλοιώδεις νεφρώνες:** τα νεφρικά σωματίδια των νεφρώνων αυτών βρίσκονται στο μέσο του νεφρικού φλοιού
- 3) **Παραμυελώδεις νεφρώνες:** τα νεφρικά σωματίδια των νεφρώνων αυτών βρίσκονται στην παραμυελώδη περιοχή, δηλαδή στην περιοχή μετάπτωσης του φλοιού στο μυελό.

Το χαρακτηριστικό των παραμυελωδών νεφρών είναι ότι οι αγκύλες του Henle είναι μακριές και πορεύονται βαθιά μέχρι τις νεφρικές θηλές. Αντίθετα, οι επιφανειακοί νεφρώνες έχουν βραχείς αγκύλες που πορεύονται μέχρι τον έξω μυελό ή το αρχικό τμήμα του έσω μυελού. Τέλος, οι μεσοφλοιώδεις νεφρώνες μπορεί να έχουν τόσο μακριές όσο και βραχείς αγκύλες.

## **1.2. Νεφρικό Σωματίο**

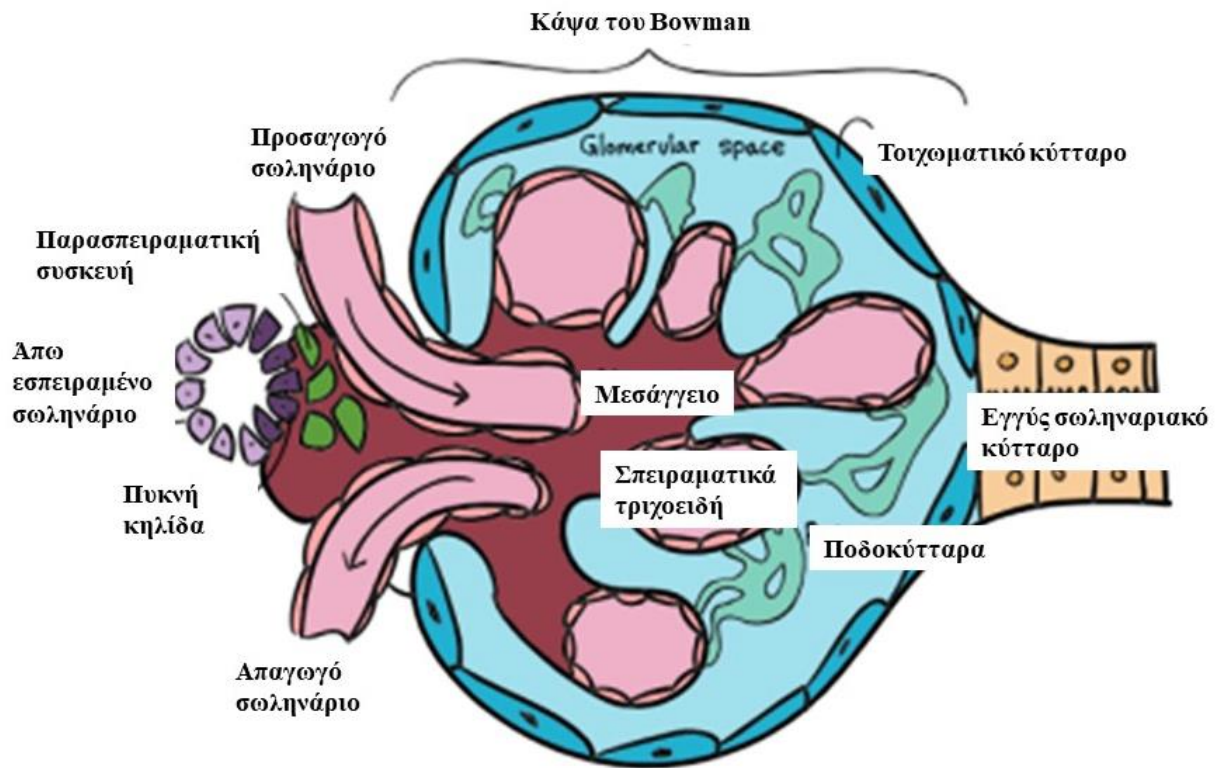
Το νεφρικό σωματίο αποτελείται από το σπείραμα και ένα επιθηλιακό έλυτρο, την κάψα του Bowman. Το σπείραμα αποτελείται από ένα θύσανο εξειδικευμένων τριχοειδών τα οποία περιέχονται μέσα σε μία σακοειδή προέκταση του σωληναρίου, την κάψα του Bowman. Τα τριχοειδή μαζί με το μεσάγγειο καλύπτονται από επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα), σχηματίζοντας το **σπλαχνικό επιθήλιο** της κάψας του Bowman. Στον αγγειακό πόλο, αυτό μεταπίπτει στο **τοιχωματικό επιθήλιο** της κάψας του Bowman. Στο χώρο μεταξύ των σπειραματικών τριχοειδών και του μεσαγγείου από τη μία πλευρά και των ποδοκυττάρων από την άλλη, αναπτύσσεται η **σπειραματική βασική μεμβράνη (ΣΒΜ)**. Ο χώρος μεταξύ των δύο στιβάδων της κάψας του Bowman αντιπροσωπεύει την ουροφόρο κοιλότητα, η οποία στον ουροφόρο πόλο συνεχίζεται ως σωληναριακός αυλός [1,4].

Το περίτονο πέταλο της κάψας του Bowman αποτελείται από πλατιά πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα. Το περισπλάχνιο πέταλο αποτελείται από έναν ιδιαίτερο τύπο επιθηλιακών κυττάρων



υψηλής διαφοροποίησης, τα **ποδοκύτταρα** που φέρουν εκβλαστήσεις, τις **ποδοειδείς εκβλαστήσεις**. Οι ποδοειδείς εκβλαστήσεις γειτονικών ποδοκυττάρων διαπλέκονται μεταξύ τους και καλύπτουν εσωτερικά το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του ενδοθηλίου των σπειραματικών τριχοειδών με την παρεμβολή της **σπειραματικής βασικής μεμβράνης**. Οι τρεις αυτές στοιβάδες (ενδοθήλιο-βασική μεμβράνη-σπλαχνικό επιθήλιο) αποτελούν την **επιφάνεια διήθησης** του νεφρικού σωματίου.

Η επιφάνεια του ενδοθηλίου που δεν καλύπτεται από το σπλαχνικό επιθήλιο έρχεται σε επαφή με το **μεσάγγειο**. Το μεσάγγειο βρίσκεται μεταξύ των σπειραματικών τριχοειδικών αγκυλών, αποτελείται από τα **μεσαγγειακά κύτταρα** και τη **μεσαγγειακή θεμέλια ουσία** και έχει ρόλο στήριξτικό για τις υπόλοιπες δομές του σπειράματος.



**Εικόνα 2.** Νεφρώνας (τροποποιημένο από: <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/organ-systems/the-renal-system/a/renal-physiology-glomerular-filtration>)

## 1. Ενδοθήλιο

Τα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούνται από κυτταρικά σώματα και από περιφερικό κυτταροπλασματικό στρώμα, το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερα μεγάλα ανοίγματα. Οι πειραματικοί ενδοθηλιακοί πόροι δεν έχουν διαφραγμάτια, τα οποία διαπιστώνονται μόνο στο ενδοθήλιο του τελικού τμήματος των απαγωγών αρτηριδίων. Οι στρογγύλοι-ωοειδείς πόροι έχουν διάμετρο από 50-100 nm. Η σωληναριακή μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι αρνητικά φορτισμένη, εξαιτίας της κυτταρικής κάλυψης από ποικίλες πολυανιονικές γλυκοπρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της ποδοκαλυξίνης [2,5].

## 2. Πειραματική βασική μεμβράνη

Η πειραματική βασική μεμβράνη (ΣΒΜ) χρησιμεύει ως σκελετός για το πειραματικό δίκτυο. Εμφανίζεται ως ένα πολύπλοκα αναδιπλούμενος σάκος, ο οποίος παρουσιάζει ένα άνοιγμα στη πειραματική πύλη. Η εξωτερική επιφάνεια αυτού του σάκου της ΣΒΜ είναι καλυμμένη εξ' ολοκλήρου από ποδοκύτταρα. Το εσωτερικό του σάκου είναι γεμάτο από τα τριχοειδή και το μεσάγγειο.

Αποτελείται από 3 στιβάδες: την πυκνή στιβάδα την Lamina densa, την εσωτερική και την εξωτερική στιβάδα. Τα κύρια συστατικά της ΣΒΜ περιλαμβάνουν κολλαγόνο τύπου IV (α3, α4, α5 αλύσους), λαμινίνη 11 και πρωτεογλυκάνες θειικής επαράνης. Το ηλεκτροαρνητικό φορτίο προκύπτει κυρίως από την παρουσία πολυανιονικών πρωτεογλυκανών [1,6].

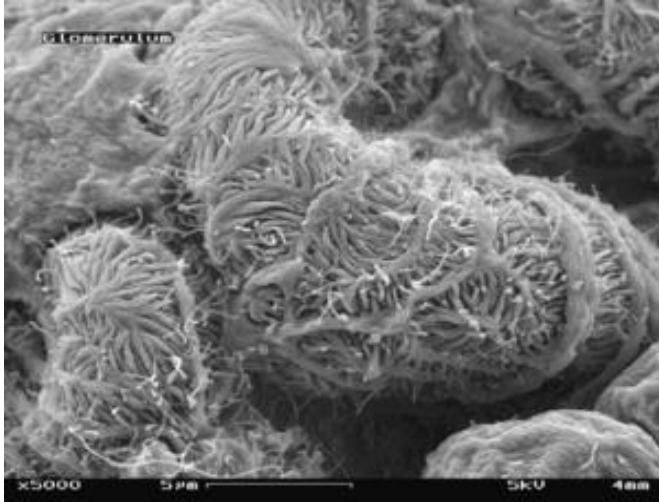
## 3. Μεσάγγειο

Τα μεσαγγειακά κύτταρα μαζί με τη μεσαγγειακή θεμέλια ουσία, δημιουργούν το πειραματικό μεσάγγειο. Τα **μεσαγγειακά κύτταρα** είναι αρκετά ακανόνιστα ως προς το σχήμα με προσεκβολές που εκτείνονται από το κυτταρικό σώμα προς τη ΣΒΜ. Σε αυτές τις προσεκβολές βρίσκονται πυκνές συσσωρεύσεις από μικροϊνίδια που περιέχουν ακτίνη, μυοσίνη και α-ακτινίνη. Τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι τροποποιημένα λεία μυϊκά κύτταρα με ικανότητα να συσπώνται, ενώ έχουν και φαγοκυτταρικές ικανότητες καθώς και ικανότητα παραγωγής συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Ένα μικρό ποσοστό των μεσαγγειακών κυττάρων (3-7%) προέρχονται από

το μυελό των οστών (μακροφάγα που έχουν διηθήσει το μεσάγγειο). Τα μεσαγγειακά κύτταρα συνδέονται με τη ΣΒΜ, είτε άμεσα είτε μέσω της μεσαγγειακής θεμέλιας ουσίας, με αποτέλεσμα η συστολή τους να επηρεάζει τη μορφολογία της επιφάνειας διήθησης. Εκτός από στηρικτικό ρόλο, τα μεσαγγειακά κύτταρα έχουν και λειτουργικό ρόλο στις διαδικασίες ρύθμισης της πειραματικής διήθησης. Η **μεσαγγειακή θεμέλια ουσία** συμπληρώνει τα ακανόνιστα κενά μεταξύ των μεσαγγειακών κυττάρων και της περιμεσαγγειακής ΣΒΜ, συνδέοντας τα μεσαγγειακά κύτταρα με τη ΣΒΜ. Αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV, V και VI και περιέχει σημαντικές ποσότητες της γλυκοπρωτεΐνης fibronectin. [1,4]

#### **4. Σπλαχνικό επιθήλιο (ποδοκύτταρα)**

Τα ποδοκύτταρα είναι κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης, τα οποία έχουν ήδη σχηματιστεί στην εμβρυϊκή ζωή. Έχουν πολυγωνική μορφή και αποτελούνται από ένα κυτταρικό σώμα με μεγάλο όγκο, το οποίο επιπλέει μέσα στην ουροφόρο κοιλότητα. Οι προσεκβολές γειτονικών ποδοκυττάρων διαπλέκονται μεταξύ τους αφήνοντας στο ενδιάμεσο σχισμές (διηθητικές σχισμές) που γεφυρώνονται μεταξύ τους διαμέσου της εξωκυττάριας δομής που ονομάζεται διαφραγματική σχισμή και αποτελεί μια δομή σχήματος φερμουάρ και περιλαμβάνει μια σειρά από πόρους περίπου  $14\text{nm}^2$ . Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι οι παρακάτω πρωτεΐνες καθορίζουν αυτή τη μεμβράνη ή μεσολαβούν στη σύνδεση της με τον κυτταρικό σκελετό της ακτίνης των ποδοειδών προσεκβολών: νεφρίνη, p-καντχερίνη, FAT1, NEPH-3, ποδοκίνη. Τα ποδοκύτταρα είναι αρνητικά φορτισμένα. Τα διηθητικά διαφραγμάτια αποτελούν το χώρο που επιτελείται η διήθηση και έχουν πάχος περίπου 30-40nm. Η λειτουργία τους έγκειται: να στηρίζουν τις τριχοειδικές αγκύλες και να αντιδρούν στις μεταβολές της ενδοπειραματικής πίεσης, να συμμετέχουν στη δημιουργία και λειτουργία του πειραματικού ηθμού διήθησης και τέλος να παράγουν και να ανακατασκευάζουν μεγάλο μέρος των δομικών συστατικών της ΣΒΜ. Από το κυτταρικό σώμα προβάλλουν προεξοχές που καταλήγουν στα τριχοειδή [7,8].



**Εικόνα 3.** Ποδοειδείς προσεκβολές που διαπλέκονται μεταξύ τους, δημιουργώντας μικρές ελικοειδείς σχισμές (διθητικές σχισμές). (Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο x 5000) [από: Heptinstall's Pathology of the Kidney, 7E (2014)]

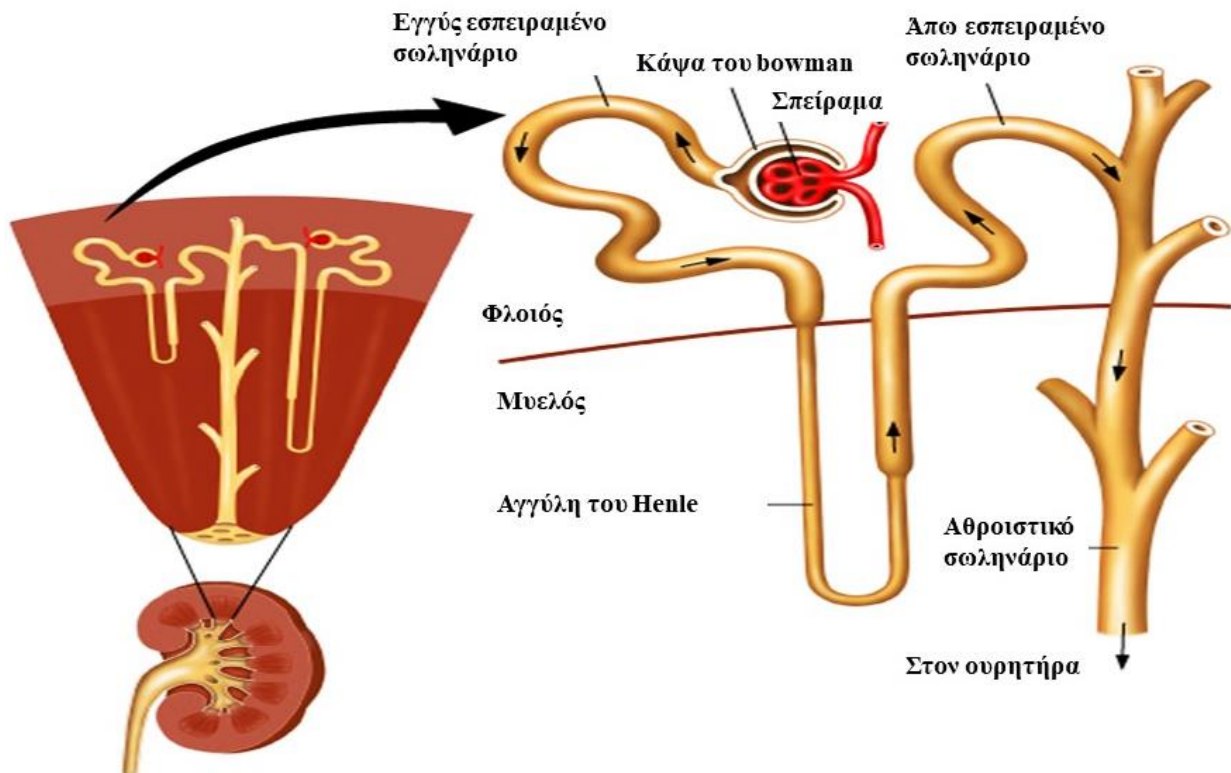
## **5. Τοιχωματικό επιθήλιο**

Το τοιχωματικό επιθήλιο της κάψας του Bowman αποτελείται από πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται τοποθετημένα πάνω σε μία βασική μεμβράνη. Τα αποπλατυσμένα κύτταρα πληρούνται από δεσμίδες ινιδίων ακτίνης, τοποθετημένες προς όλες τις κατευθύνσεις. Η τοιχωματική βασική μεμβράνη, διαφέρει από την ΣΒΜ στο ότι περιέχει αρκετές στιβάδες με πυκνές πρωτεογλυκάνες, οι οποίες εκτός από το κολλαγόνο τύπου IV, περιέχουν και κολλαγόνο τύπου XIV [1].

## **1.2. Νεφρικό Σωληνάριο**

Το νεφρικό σωληνάριο διαιρείται σε συγκεκριμένα τμήματα: το εγγύς, το ενδιάμεσο, το άπω συνδετικό και το αθροιστικό σωληνάριο [1-3]. Η αγκύλη του Henle περιλαμβάνει το ευθύ τμήμα του εγγύς σωληναρίου (αντιπροσωπεύει το παχύ κατιόν σκέλος), το λεπτό κατιόν και το λεπτό ανιόν σκέλος και το παχύ ανιόν σκέλος το οποίο περιλαμβάνει την πυκνή κηλίδα.

Τα σωληνάρια επενδύονται από μονόστιβο επιθήλιο, που επικάθεται στη βασική μεμβράνη. Πρόκειται για εξειδικευμένο στη μεταφορά επιθήλιο, αποτελούμενο από αποπλατυσμένα ή κυβοειδή επιθηλιακά κύτταρα. Τα κύτταρα είναι διατεταγμένα έτσι ώστε να διευκολύνουν 2 τύπους μεταφοράς: έναν διαμέσου των κυττάρων (διακυτταρικός) και έναν ανάμεσα από τα κύτταρα (παρακυτταρικός).



**Εικόνα 4.** Νεφρικό σωληνάριο (από: [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com))

### 1. Εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο

Το εγγύς σωληνάριο επανααρροφά το μεγαλύτερο μέρος του διηθούμενου ύδατος και διαλυτών ουσιών. Το επιθήλιο του εμφανίζει μια έντονη λαχνωτή επιφάνεια (που αυξάνει το συνολικό εμβαδόν) και πολυάριθμες πτυχώσεις στη βασικοπλάγια μεμβράνη (αυξάνοντας την επιφάνεια).

Τα κύτταρα του εγγύς έχουν μεγάλα μιτοχόνδρια στη βασικοπλάγια μεμβράνη τους σε στενή επαφή με τη Na/K/ΑΤΡάση, η οποία είναι κινητήριος δύναμη της διακυτταρικής μεταφοράς. Η μεταφορά Na μέσα στο κύτταρο από την πλευρά του αυλού γίνεται μέσω του ανταλλαγέα Na/H. Στην κορυφαία πλευρά υπάρχει λυσοσωματικό σύστημα που είναι υπεύθυνο για την επαναρρόφιση των μακρομορίων (πολυπεπίδια και πρωτεΐνες), τα οποία διέφυγαν από τον σπειραματικό φραγμό [9].

## **2. Αγκύλη του Henle**

Αποτελείται από το ευθύ τμήμα του εγγύς σωληναρίου, το λεπτό κατιόν, το λεπτό ανιόν (στις μακρές αγκύλες) και το παχύ ανιόν σκέλος. Η λεπτή κατιούσα μοίρα είναι ιδιαίτερα διαπερατή για το νερό (λόγω της ακουαπορίνης I), ενώ η λεπτή ανιούσα είναι αδιαπέραστη. Η παχιά ανιούσα μοίρα είναι αδιαπέραστη για το νερό αλλά μπορεί να επαναρροφήσει μεγάλες ποσότητες NaCl. Το NaCl παγιδεύεται στο μυελό, ενώ το νερό μεταφέρεται στη φλοιώδη μοίρα και επιστρέφει στη συστηματική κυκλοφορία. Ο μεταφορέας Na σε αυτό το κομμάτι είναι ο Na/K/2Cl, ο οποίος είναι ο στόχος των διουρητικών της αγκύλης. Οι στενές συνδέσεις της παχιάς ανιούσας μοίρας εμφανίζουν περιορισμένη διαπερατότητα. Επιπλέον, σε αυτό το σημείο συντίθεται και απεκκρίνεται η πρωτεΐνη Tamm Horsfall, η οποία είναι προστατευτική έναντι των νεφρικών λίθων. Σε αντίθεση με το εγγύς, τα κύτταρα εμφανίζουν ελάχιστες μικρολάχνες. Λίγο πριν τη μετάπτωση στο άπω εσπειραμένο, το παχύ ανιόν σκέλος περιέχει την πυκνή κηλίδα, η οποία προσκολλάται στο αντίστοιχο σπείραμα [1].

## **3. Άπω εσπειραμένο σωληνάριο**

Το επιθήλιο παρουσιάζει τις περισσότερες προσεκβολές στη βασικοπλάγια μεμβράνη και τα περισσότερα μιτοχόνδρια από όλα τα άλλα κύτταρα του νεφρώνα. Στη σωληναριακή μεμβράνη περιέχει πολυάριθμες μικρολάχνες. Εδώ ο ειδικός μεταφορέας είναι ο συμμεταφορέας Na-Cl, ο οποίος είναι ο στόχος των θειαζιδικών διουρητικών [1].

#### 4. Σύστημα αθροιστικών σωληναρίων

Το σύστημα των αθροιστικών σωληναρίων περιλαμβάνει το συνδετικό σωληνάριο και τα φλοιϊκά και μυελικά αθροιστικά σωληνάρια. Δύο ειδών τύποι κυττάρων περιέχονται στο επιθήλιο: τα **θεμέλια κύτταρα** και τα **εμβόλιμα κύτταρα**. Και τα δύο κύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη δράση της αντιδιουρητικής ορμόνης, ενώ τα εμβόλιμα κύτταρα δεν αντιδρούν στη δράση των αλατοκορτικοειδών. Τα κύρια κύτταρα είναι πολυγωνικά που αυξάνονται σε μέγεθος όσο πλησιάζουν προς το κορυφαίο τμήμα της θηλής. Η βασική επιφάνεια αυτών των κυττάρων χαρακτηρίζεται από πτυχώσεις της βασικής μεμβράνης. Καθόλου το μήκος του σωληναρίου τα κύτταρα αυτά περιέχουν ένα παλίνδρομο σωληναριακό σύστημα για την υδατοπορίνη 2, υπό τον έλεγχο της αντιδιουρητικής ορμόνης, με το οποίο ορίζεται η διαβατότητα στο νερό. Στην επιφάνεια προς τον αυλό υπάρχει ένα κανάλι Na, το οποίο είναι ευαίσθητο στη δράση της αμιλορίδης, που ρυθμίζει την απαντητικότητα του αθροιστικού σωληναρίου στη δράση της αλδοστερόνης.

Τα εμβόλιμα κύτταρα χαρακτηρίζονται ως A και B, τα οποία διαφέρουν όσον αφορά τα δομικά, ανοσοκυτταροχημικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Τα A κύτταρα εκφράζουν τη H-ATPάση στη σωληναριακή μεμβράνη και εκκρίνουν πρωτόνια. Τα B κύτταρα εκφράζουν τη H-ATPάση στη βασικοπλάγια μεμβράνη τους και εκκρίνουν διττανθρακικά και επανααρροφούν πρωτόνια. Τα αθροιστικά σωληνάρια είναι η τελευταία θέση ρύθμισης των υγρών του σώματος και με τη δράση της αντιδιουρητικής ορμόνης ρυθμίζουν την ωσμωτικότητα των ούρων [1,10].

#### 1.3. Διάμεσος Ιστός

Ο διάμεσος νεφρικός ιστός είναι σχετικά αραιός. Το ποσοστό στο φλοιό κυμαίνεται από 5-7% (με μία τάση να αυξάνεται με την ηλικία). Αυξάνεται κατά μήκος του μυελού από το φλοιό προς τη θηλή (μπορεί να φτάσει και το 30%). Αποτελείται από ινοβλάστες, τα οποία στηρίζουν τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία που περιβάλλει ο διάμεσος ιστός και από διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, που έχουν μεταναστεύσει εκεί. Ο διάμεσος χώρος ανάμεσα από τα κύτταρα καλύπτεται από τη διάμεση ουσία (πρωτεογλυκάνες, γλυκοπρωτεΐνες, ινίδια και διάμεσο

υγρό). Μια υποομάδα των ινοβλαστών (οι 5'-NT θετικοί) του νεφρικού φλοιού είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της ερυθροποιητίνης [11].

#### **1.4. Νεφρική Αιμάτωση**

Οι νεφροί αν και αποτελούν το 0.5% της συνολικής σωματικής μάζας, δέχονται το 20% της καρδιακής παροχής, έχουν δηλαδή 40 φορές μεγαλύτερη αιμάτωση από τη μέση αιμάτωση των λοιπών οργάνων του ανθρώπου.

Η αιμάτωση κάθε νεφρού συνήθως αποτελείται από μία **κύρια νεφρική αρτηρία** η οποία προέρχεται από την κοιλιακή αορτή. Δεν είναι σπάνιες βέβαια ανατομικές παραλλαγές, όπου υπάρχουν περισσότερες από μία κύριες νεφρικές αρτηρίες.

Η κύρια νεφρική αρτηρία χωρίζεται σε πρόσθιο και οπίσθιο κλάδο, ενώ ο πρόσθιος κλάδος χωρίζεται σε **τμηματικές αρτηρίες**. Όλες οι προαναφερθείσες αρτηρίες είναι τελικές, δεν αναστομώνονται δηλαδή μεταξύ τους, και η απόφραξη τους οδηγεί σε ισχαιμική νέκρωση του αντίστοιχου νεφρικού ιστού. Σπάνια, σε πολύ σταδιακή εγκατάσταση της αρτηριακής απόφραξης δίνεται ο χρόνος σχηματισμού παράπλευρης αγγείωσης π.χ από επινεφριδιακά αγγεία, που επιτρέπει τη βιωσιμότητα, όχι όμως και τη λειτουργικότητα του αποφραγμένου νεφρικού ιστού.

Από τις τμηματικές αρτηρίες ξεκινούν οι **μεσολόβιες αρτηρίες** οι οποίες πορεύονται κατά μήκος των στηλών του Bertini μεταξύ των νεφρικών πυραμίδων. Από αυτές εκφύονται οι **τοξοειδείς αρτηρίες**, στο ύψος της φλοιομυελώδους συμβολής, οι οποίες πορεύονται κατά μήκος αυτής και δίνουν γένεση στις **μεσολοβίδιες αρτηρίες** που διασχίζουν το φλοιό με κατεύθυνση προς τη νεφρική κάψα. Κατά την πορεία αυτή και σε όλα τα επίπεδα του φλοιού από τις τοξοειδείς αρτηρίες εκφύονται τα **προσαγωγά αρτηρίδια** των σπειραμάτων από τα οποία αρχίζει η σπειραματική κυκλοφορία.

Τα σπειραματικά τριχοειδή είναι μοναδικά καθώς υπάρχουν αγγεία αντίστασης (προσαγωγό και απαγωγό αρτηρίδιο) τόσο πριν όσο και μετά από αυτά. Το **προσαγωγό αρτηρίδιο** είναι το κύριο σημείο ρύθμισης των προσπειραματικών αντιστάσεων. Εισερχόμενο στην κάψα του Bowman χωρίζεται σε άφθονα τριχοειδή, τα οποία συμμετέχουν όπως αναφέρθηκε στη δημιουργία της επιφάνειας διήθησης. Το **απαγωγό αρτηρίδιο** είναι μικρότερο σε μήκος από το προσαγωγό, αλλά



λόγω του μικρού του εύρους προβάλλει σημαντική αντίσταση στη νεφρική ροή. Εξέρχεται του σπειράματος και χωρίζεται σε περισωληναριακά τριχοειδή που τροφοδοτούν τα νεφρικά σωληνάκια. Τα απαγωγά αρτηρίδια του έσω φλοιού δίνουν γένεση στα ευθέα αγγεία τα οποία κατευθύνονται προς τον έσω μυελό μέχρι τις νεφρικές θηλές. Εκτός από το ρόλο τους στην αιμάτωση του έσω μυελού, συμμετέχουν στο μηχανισμό συμπίκνωσης των ούρων [1-3].

## **2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΝΕΦΡΟΥ**

Η κύρια λειτουργία του νεφρού είναι να διατηρεί σταθερό το εσωτερικό περιβάλλον διαμέσου της εκλεκτικής κατακράτησης ή αποβολής ύδατος, ηλεκτρολυτών και άλλων διαλυμένων ουσιών [12]. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια τριών διαδικασιών: 1. Της **διήθησης** του κυκλοφορούντος αίματος από το σπείραμα, ώστε να σχηματίζεται ένα υπερδιήθημα πλάσματος στο χώρο του Bowman 2. Της **εκλεκτικής επαναρρόφησης** (από το σωληναριακό διήθημα προς το πλάσμα) διαμέσου των κυττάρων του νεφρικού σωληναρίου και 3. Της **εκλεκτικής έκκρισης** (από το σωληναριακό τριχοειδικό αίμα στο σωληναριακό αυλό).

Οι **λειτουργίες του νεφρού** αναλυτικά είναι: 1. Ρύθμιση του εξωκυττάρου όγκου και της σύστασης του. 2. Ρύθμιση των ηλεκτρολυτών. 3. Ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας. 4. Αποβολή προϊόντων του μεταβολισμού και ξένων ουσιών. 5. Παραγωγή ορμονών (ρενίνη, ερυθροποιητίνη, προσταγλανδίνες) 6. Γλυκονεογένεση 7. Ενεργοποίηση της Vit D3.

### **Επιφάνεια διήθησης**

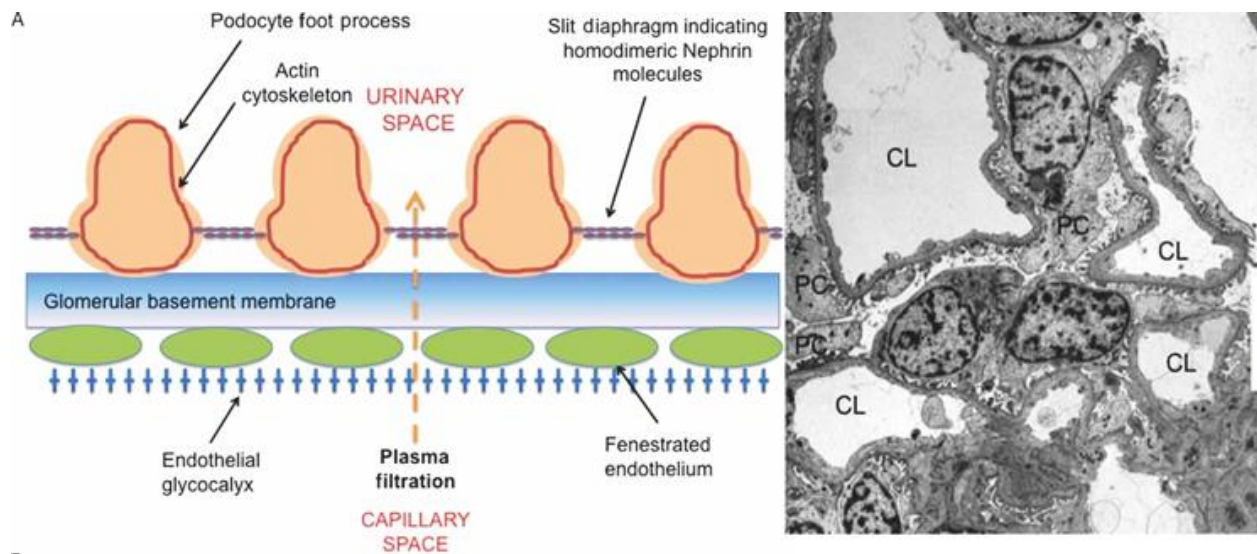
Η επιφάνεια διήθησης αποτελείται από τρεις στιβάδες:

- 1) **Ενδοθήλιο**
- 2) **Σπειραματική βασική μεμβράνη**
- 3) **Σπλαχνικό επιθήλιο της κάψας του Bowman**

Το **σπειραματικό ενδοθήλιο** αποτελείται από μεγάλα επίπεδα ενδοθηλιακά κύτταρα. Πρόκειται για θυριδωτό ενδοθήλιο χωρίς διαφράγματα, ώστε να δημιουργούνται οι απαραίτητοι για τη διέλευση του διηθήματος πόροι. Η κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων περιέχει υψηλή συγκέντρωση πολυανιονικών γλυκοπρωτεϊνών (κυρίως ποδοκαλυξίνη) που προσδίδουν αρνητικό φορτίο σε αυτή.

Η **σπειραματική βασική μεμβράνη** παράγεται από το σπλαχνικό επιθήλιο και αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV, γλυκοπρωτεΐνες (λαμινίνη και εντακτίνη) και πρωτεογλυκάνες (θειϊκή ηπαράνη). Το κολλαγόνο τύπου IV αποτελείται κυρίως από α3, α4 και α5 αλύσους. Σε μεταλλάξεις των αλύσεων αυτών που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα της βασικής μεμβράνης οφείλεται το σύνδρομο Alport. Η λαμινίνη συνδέεται με το κολλαγόνο μέσω της εντακτίνης και με τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ιντεγκρινών, συμβάλλοντας στη στήριξη των δομών της επιφάνειας διήθησης. Η θειϊκή ηπαράνη είναι πολυανιονική πρωτεογλυκάνη που προσδίδει αρνητικό φορτίο στη βασική μεμβράνη.

Το **σπλαχνικό επιθήλιο** της κάψας του Bowman σχηματίζεται από τις ποδοειδείς εκβλαστήσεις των ποδοκυττάρων. Μεταξύ των εκβλαστήσεων σχηματίζονται σχισμές που καλύπτονται μερικώς από διάφραγμα. Έτσι δημιουργούνται πόροι (διαμέτρου περίπου 4 nm) για τη διέλευση του διηθήματος. Η κυτταρική μεμβράνη στην περιοχή των πόρων περιέχει πρωτεογλυκάνες (όπως η ποδοκαλυξίνη) που της προσδίδουν αρνητικό φορτίο.



**Εικόνα 5.** Σπειραματικός ηθμός διήθησης (από: <https://doi.org/10.1002/path.2661>)

Η επιφάνεια διήθησης παρουσιάζει δύο ειδών φραγμούς στη διήθηση ουσιών:

**Φραγμό μεγέθους:** ο φραγμός αυτός εξασφαλίζει μειωμένο ρυθμό διήθησης για ουσίες μεγαλομοριακές, με διάμετρο μεγαλύτερη από αυτή των πόρων της επιφάνειας διήθησης. Αντίθετα το νερό, τα ιόντα και οι μικρομοριακές ουσίες διηθούνται ελεύθερα.

**Φραγμό φορτίου:** με το φραγμό αυτό επιτυγχάνεται μειωμένος ρυθμός διήθησης για αρνητικά φορτισμένες ουσίες, λόγω των αρνητικά φορτισμένων μορίων που υπάρχουν και στις τρεις στιβάδες της επιφάνειας διήθησης όπως αναφέρθηκε. Έτσι η αλβουμίνη παρότι έχει διάμετρο μικρότερη των πόρων της επιφάνειας διήθησης συγκρατείται στο πλάσμα λόγω του αρνητικού της φορτίου.

Λόγω της ύπαρξης των φραγμών διήθησης, οι πρωτεΐνες διηθούνται με πολύ αργό ρυθμό. Η συνολική ημερήσια ποσότητα διηθήματος (180 λίτρα) φυσιολογικά περιέχει μόνο 1-2 γραμμάρια πρωτεΐνης. Το ποσό αυτό επαναρροφάται σχεδόν πλήρως από τα σωληναριακά κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου και το τελικό ποσό πρωτεΐνης στα ούρα είναι μικρότερο από 150 mg/ημέρα. Αύξηση του λευκώματος ούρων (πρωτεϊνουρία) μπορεί να δημιουργηθεί σε:

- 1) Βλάβη του φραγμού μεγέθους της διηθητικής μεμβράνης
- 2) Βλάβη του φραγμού φορτίου της διηθητικής μεμβράνης
- 3) Βλάβη στη σωληναριακή επαναρρόφιση των πρωτεϊνών
- 4) Αύξηση του φορτίου διήθησης των πρωτεϊνών

Σε κάθε περίπτωση διαφορετικές πρωτεΐνες εμφανίζονται στα ούρα και η μελέτη τους μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση του μηχανισμού πρόκλησης της πρωτεϊνουρίας [13,14].

### 3. ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΝΕΦΡΙΤΙΔΕΣ-ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Οι σπειραματονεφρίτιδες εμφανίζουν ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις, από τον ασυμπτωματικό ασθενή, στον οποίο διαγιγνώσκεται υπέρταση, οίδημα, πρωτεϊνουρία ή αιματουρία στα πλαίσια τακτικού ελέγχου μέχρι τον ασθενή με κεραυνοβόλο εισβολή της νόσου με οξεία νεφρική βλάβη. Η λήψη ιστορικού, η φυσική εξέταση, ο εργαστηριακός έλεγχος και η βιοψία νεφρού είναι απαραίτητα στοιχεία για την εξακρίβωση μιας σπειραματοπάθειας.

#### **3.1 Ιστορικό και Φυσική Εξέταση**

Με τη λήψη λεπτομερούς ιστορικού αναζητούνται τα παρακάτω συμπτώματα ή καταστάσεις που σχετίζονται με την εμφάνιση ή όχι μιας σπειραματοπάθειας.

- 1) Αρτηριακή υπέρταση, οίδημα, αιματουρία, εξάνθημα, αρθραλγίες
- 2) Νυκτουρία ή πολυουρία, αφρίζοντα ούρα, απώλεια σωματικού βάρους, αδυναμία
- 3) Λήψη φαρμάκων
- 4) Οικογενειακό ιστορικό
- 5) Χρόνος έναρξης συμπτωμάτων
- 6) Οξεία ή χρόνια λοίμωξη
- 7) Κακοήθεια

Μια συστηματική αγγειίτιδα μπορεί να συνοδεύεται από αιμορραγικό εξάνθημα, αδυναμία, αναιμία, απώλεια σωματικού βάρους, εμπύρετο και προσβολή άλλων οργάνων (πνεύμονας, νευρικό σύστημα). Περιπτώσεις συγγενών νεφρικών νόσων περιλαμβάνουν το σύνδρομο Alport (ιδιαίτερα αν συνοδεύεται από απώλεια ακοής), ασυνήθεις συγγενείς μορφές IgA νεφροπάθειας και την εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση. Επιπλέον, διάφορα φάρμακα έχουν συσχετιστεί με σπειραματοπάθειες όπως τα ΜΣΑΦ (νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων, μεμβρανώδης), πενικιλλαμίνη (μεμβρανώδης), παμιδρονάτη (ΕΤΣΣ). Επίσης, οξείες λοιμώξεις (στρεπτοκοκκική, λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα, ιογενείς) έχουν συσχετιστεί με μεταλοιμώδη σπειραματονεφρίτιδα, μεμβρανοϋπερπλαστική και οξεία διάμεση νεφρίτιδα, αλλά και χρόνιες λοιμώξεις όπως HIV, HBV, HCV έχουν συσχετιστεί με ΕΤΣΣ, μεμβρανοϋπερπλαστική, μεμβρανώδη. Ποικίλα κακοήθη νεοπλάσματα σχετίζονται επίσης με σπειραματικές νόσους, όπως

κακοήθεια μαστού, πνεύμονα και του γαστρεντερικού (μεμβρανώδης), νόσος Hodgkin (NEA), non-Hodgkin λέμφωμα (μεμβρανοϋπερπλαστική).

Στη περίπτωση του νεφρωσικού συνδρόμου, το οίδημα είναι περιοφθαλμικό κατά τις πρώτες πρωϊνές ώρες σε αντίθεση με την καρδιακή ανεπάρκεια. Τα ξανθελάσματα εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της υπερλιπιδαιμίας, όταν συνοδεύεται από σοβαρό νεφρωσικό σύνδρομο. Τέλος, η πορφύρα μπορεί να εμφανιστεί στις αγγείτιδες, συστηματικό ερυθματώδη λύκο, σε κρυσταλλοαριαιμία ή ενδοκαρδίτιδα.

### **3.2 Κλινικές Εκδηλώσεις**

Οι κλινικές εκδηλώσεις ποικίλλουν από άτομο σε άτομο. Ορισμένοι ασθενείς μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί με μόνο εύρημα τη λευκωματουρία από 150mg-3gr/24ώρο ή/και μικροσκοπικής αιματουρίας σπειραματικής προέλευσης, ενώ άλλοι μπορεί να εμφανίζουν νεφρωσικό σύνδρομο ή οξύ νεφριτικό σύνδρομο ή ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα.

Το **νεφρωσικό σύνδρομο** χαρακτηρίζεται από παρουσία λευκωματουρίας σε ενήλικες >3,5 gr/24ώρο και σε παιδιά >40mg/ώρα/m<sup>2</sup>, υποαλβουμιναιμία <3,5g/dl, οίδημα, υπερλιπιδαιμία και λιπιδουρία. Οι κυριότερες επιπλοκές αποτελούν η ευπάθεια σε λοιμώξεις και σε θρομβοεμβολικά επεισόδια. Τα αίτια ιδιοπαθούς νεφρωσικού αποτελούν: η μεμβρανώδη, η νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων και η εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση. Στα δευτεροπαθή αίτια περιλαμβάνεται ο σακχαρώδης διαβήτης, η αμυλοείδωση, ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος κ.α. Οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για την λευκωματουρία αποτελούν η διαταραχή του φραγμού μεγέθους ή του φραγμού φορτίου της τριχοειδικής σπειραματικής μεμβράνης. Όταν λόγω ανοσολογικών διαταραχών ή φλεγμονωδών καταστάσεων παρουσιάζεται βλάβη της δομής των συστατικών της βασικής μεμβράνης, ουσίες με διάμετρο μεγαλύτερη από αυτή των πόρων της επιφάνειας διήθησης, όπως οι μεγαλομοριακές σφαιρίνες, μετακινούνται στο χώρο του Bowman. Η διαταραχή του φορτίου σχετίζεται με τη σχετική απώλεια του αρνητικού φορτίου του ενδοθηλίου και της σπειραματικής βασικής μεμβράνης λόγω της μειωμένης παρουσίας σιαλογλυκοπρωτεϊνών,θειικής επαράνης, και πρωτεογλυκανών, συστατικών που ευθύνονται για

την παρουσία αρνητικού φορτίου στον πειραματικό τριχοειδικό φραγμό. Σε καταστάσεις όπου υπάρχει διαταραχή αυτού του φορτίου, τότε ουσίες όπως η αρνητικά φορτισμένη λευκοματίνη, που φυσιολογικά απωθείται από την επιφάνεια διήθησης μπορεί να περάσουν στο χώρο του Bowman.

**Το νεφριτιδικό σύνδρομο** χαρακτηρίζεται από μείωση του ρυθμού πειραματικής διήθησης, πρωτεϊνουρία από 150mg έως 3gr/24ώρο, οίδημα, αρτηριακή υπέρταση και αιματοουρία πειραματικής προέλευσης. Αποτελεί εκδήλωση οξείας πειραματονεφρίτιδας και παρατηρείται σε IgA νεφροπάθεια, μεταλοιμώδη και νεκρωτική πειραματονεφρίτιδα με μηνοειδείς σχηματισμούς. Η **οξεία νεφρική βλάβη** που συνοδεύεται οφείλεται συνήθως σε αιμοδυναμικά ή και τοξικά αίτια. Αλλα αίτια είναι η απόφραξη του ουροποιητικού συστήματος, νοσήματα του διαμεσοσωληναριακού χώρου (προσβολή του νεφρού σε πολλαπλό μύελωμα), νοσήματα των νεφρικών αγγείων (HUS, TTP, σκληρόδερμα) και πειραματικά νοσήματα που εκδηλώνονται ως **ταχέως εξελισσόμενη πειραματονεφρίτιδα (ΤΕΣΝ)**, η οποία εκτός από την ταχεία επιδείνωση νεφρικής λειτουργίας χαρακτηρίζεται και από την παρουσία μηνοειδών σχηματισμών στη νεφρική βιοψία. Με την εικόνα της ταχέως εξελισσόμενη πειραματονεφρίτιδα εκδηλώνεται η anti-GBM νόσος, η ANCA-σχετιζόμενη αγγειίτιδα, η κρυσφαιριναιμική αγγειίτιδα, η IgA αγγειίτιδα, η μεταλοιμώδης και ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος.

### **3.3 Εργαστηριακός Έλεγχος**

Ο υπολογισμός της νεφρικής λειτουργίας και η προσεκτική εξέταση των ούρων είναι σημαντικής σημασίας. Η ύπαρξη και η ποσότητα της **λευκοματουρίας**, καθώς και η παρουσία ή απουσία **ενεργού ιζήματος ούρων** [δύσμορφα ερυθρά >40% ή >5% ακανθοκύτταρα ή ένας ή περισσότεροι ερυθροκυτταρικοί κύλινδροι σε 50 χαμηλής μεγέθυνσης πεδία (x160)] βοηθούν στην ταξινόμηση της κλινικής οντότητας.

Επιπλέον συγκεκριμένες ορολογικές εξετάσεις μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση. Αυτές περιλαμβάνουν τα αντιπυρηνικά αντισώματα και τα αντισώματα εναντίον της έλικας του DNA (anti-dsDNA) (σε ΣΕΛ), κρυσφαιρίνες (σε κρυσφαιριναιμία), τα αντισώματα έναντι της

βασικής μεμβράνης του σπειράματος (anti-GBM) (σε νόσο Goodpasture), τα αντιουδετεροφιλικά κυτταροπλασματικά αντισώματα (ANCA) (σε ανοσοπενική αγγειίτιδα), αντισώματα έναντι του υποδοχέα της φωσφολιπάσης 2 (anti-PLA2R) (σε ιδιοπαθή μεμβρανώδη). Επίσης η ηλεκτροφόρηση ορού και ούρων ανιχνεύει μονοκλωνική γαμμαπάθεια καθώς και η εκτίμηση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος με την μέτρηση C3, C4 είναι ιδιαίτερα βοηθητική για τον περιορισμό των νόσων της διαφορικής διάγνωσης.

### **3.4 Βιοψία Νεφρού**

Η βιοψία νεφρού είναι απαραίτητη γενικά για τον προσδιορισμό του τύπου της σπειραματικής νόσου, όπως και για την πρόγνωση και τις θεραπευτικές αποφάσεις.

Ενδείξεις για διενέργεια βιοψία νεφρού αποτελούν:

- 1) Νεφρωσικό σύνδρομο σε ενήλικες. Σε παιδιά με νεφρωσικό σύνδρομο συνήθως δε γίνεται βιοψία καθώς η πλειοψηφία των περιπτώσεων οφείλεται σε ΝΕΑ, η οποία συνήθως ανταποκρίνεται στα κορτικοειδή.
- 2) Μικροσκοπική αιματουρία και λευκωματουρία
- 3) Λευκωματουρία υπονεφρωσικού εύρους (λιγότερο καθιερωμένη ένδειξη)
- 4) Κλινικό σύνδρομο ταχέως εξελισσόμενης σπειραματονεφρίτιδας
- 5) Συστηματικό νόσημα με πιθανή νεφρική προσβολή
- 6) Ανεξήγητη νεφρική ανεπάρκεια οποιασδήποτε αιτιολογίας

Η βιοψία νεφρού είναι γενικά ασφαλής, ιδιαίτερα όταν διενεργείται από έμπειρο άτομο με υπερηχογραφική καθοδήγηση. Ο κίνδυνος αιμορραγίας είναι 1-2% σε ασθενείς χωρίς διαταραχές πήξης. Με βάση τη βιοψία νεφρού (οπτικό μικροσκόπιο, ανοσοφθορισμός, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο) γίνεται η ταξινόμηση των σπειραματικών παθήσεων και αποφασίζεται η χορήγηση κατάλληλης αγωγής.

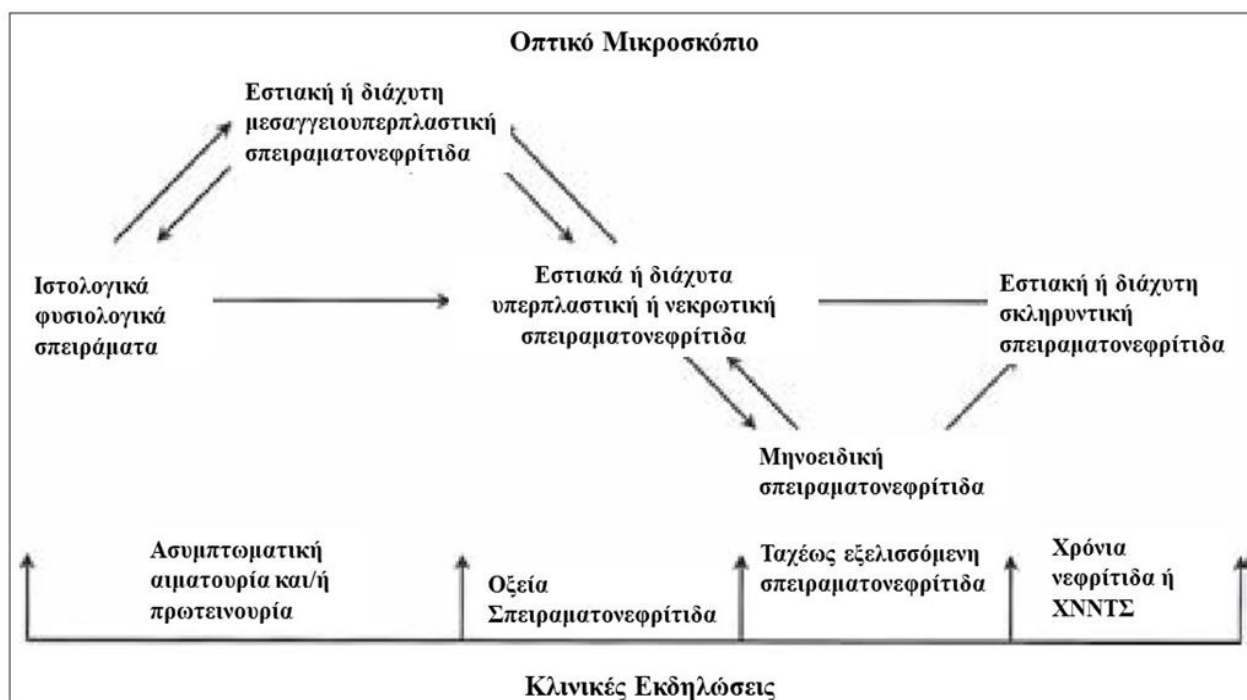
## Ιστολογική κατάταξη

Η εξέταση του υλικού της νεφρικής βιοψίας περιλαμβάνει την απλή μικροσκόπηση, την ηλεκτρονική μικροσκόπηση και τον έλεγχο για εναποθέσεις συμπληρώματος και ανοσοσφαιρινών με την τεχνική του ανοσοφθορισμού και της ανοσοϋπεροξειδάσης. Η ποιότητα της βιοψίας νεφρού εξαρτάται από τον αριθμό των σπειραμάτων. Είναι γενικώς αποδεκτό ότι 10-15 σπειράματα είναι αρκετά, πολλές φορές 6-10 είναι επαρκή και σε ορισμένες περιπτώσεις 1 σπείραμα μπορεί να θέσει τη διάγνωση [15,16]

### 1. Απλή μικροσκόπηση

Η ιστολογική βλάβη μπορεί να χαρακτηρίζεται ως **εστιακή** (όταν προσβάλλονται μόνο ορισμένα σπειράματα) ή ως **διάχυτη**. Σε κάθε σπείραμα, η βλάβη μπορεί να είναι **τμηματική** (όταν προσβάλλεται μόνο ένα τμήμα του σπειράματος) ή **σφαιρική**. Οι βλάβες επίσης μπορεί να είναι κυτταροβριθείς, είτε μέσω αύξησης της ενδογενούς ενδοθηλιακής ουσίας και του αριθμού των μεσαγγειακών κυττάρων (**υπερπλαστικός τύπος**), είτε εξαιτίας της παρατηρούμενης διήθησης από φλεγμονώδη λευκοκύτταρα (**εξοιδηματικός τύπος**). Η σοβαρή οξεία φλεγμονή μπορεί να προκαλέσει **σπειραματική νέκρωση**, η οποία συχνά είναι τμηματική. Το τοίχωμα των σπειραματικών τριχοειδών μπορεί να βρεθεί παχυσμένο εξαιτίας αύξησης του πάχους της σπειραματικής βασικής μεμβράνης και των ανοσο-εναποθέσεων. **Τμηματική σκλήρυνση** μπορεί επίσης να παρατηρηθεί και χαρακτηρίζεται από σύμπτωση των τριχοειδών και από συσσώρευση υαλίνης και μεσαγγειακής ουσίας, ενώ δεν είναι σπάνια και η προσκόλληση του τριχοειδικού τοιχώματος στην κάψα του Bowman (συμφύσεις).



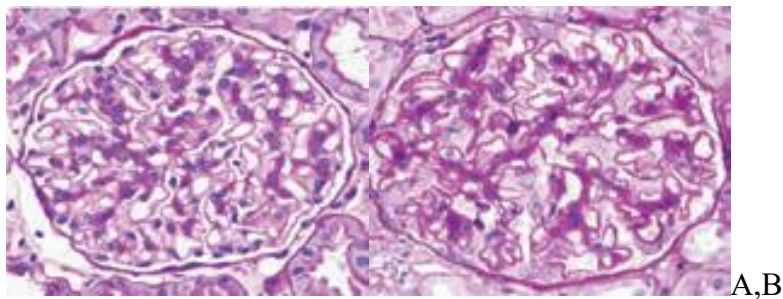


**Εικόνα 6.** Ιστολογική κατάταξη με βάση το οπτικό μικροσκόπιο και τις κλινικές εκδηλώσεις. [τροποποιημένο από: Heptinstall's Pathology of the Kidney, 7E (2014)]

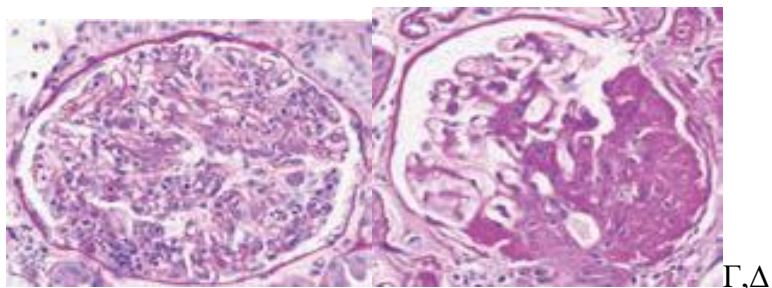
Οι κλασικές χρώσεις που χρησιμοποιούνται στην απλή μικροσκόπηση είναι αυτή της **αιματοξυλίνης-εωσίνης** και η **αντίδραση περιοδικού οξέος κατά Schiff (PAS)**, η οποία είναι ιδανική για την εκτίμηση των κυττάρων και την διαστολή της θεμέλιας ουσίας. Πιο ειδικές χρώσεις είναι αυτή της **μεθαμίνης-αργύρου**, η οποία βάφει τη σπειραματική βασική μεμβράνη και τη θεμέλια ουσία με μαύρο χρώμα. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να διαπιστωθεί ένα διπλό **περίγραμμα στη ΣΒΜ** (εικόνα διπλής παρυφής), εξαιτίας της παρεμβολής κυτταρικού υλικού ή μπορεί ακόμη και να παρατηρηθεί μία αύξηση της μεσαγγειακής θεμέλιας ουσίας, η οποία δε φαίνεται εύκολα με άλλες τεχνικές. Η **τρίχρωμη χρώση** είναι χρήσιμη για την ανάδειξη περιοχών με ουλώδη ιστό (μπλε χρώμα), ενώ οι ανοσοεναποθέσεις παίρνουν κόκκινο χρώμα. Επιπλέον, η χρώση **Congo red** χρωματίζει με κόκκινο χρώμα τα ινίδια της αμυλοείδωσης.

Οι **μυνοειδείς σχηματισμοί** αποτελούν συλλογές φλεγμονωδών κυττάρων στο χώρο του Bowman. Αναπτύσσονται όταν οι σοβαρές σπειραματικές βλάβες οδηγούν σε περιοχική ρήξη του τοιχώματος του τριχοειδούς ή της κάψας του Bowman. Οι μυνοειδείς σχηματισμοί αποτελούνται από υπερπλαστικά τοιχωματικά και θυριδωτά επιθηλιακά κύτταρα, από ινοβλάστες και από

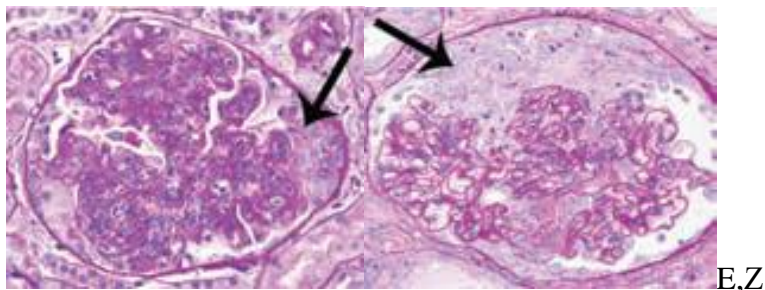
λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα-μακροφάγα, στα οποία συχνά παρατηρείται χαρακτηριστική εναπόθεση ινικής. Η δράση τους πολλές φορές είναι καταστροφική και αυξάνονται ταχύτατα σε μέγεθος, οδηγώντας σε απόφραξη του σπειράματος. Όταν ο μηχανισμός της οξείας βλάβης διακόπτεται, οι μηνοειδείς σχηματισμοί μπορούν είτε να εξαφανιστούν με ταυτόχρονη αναδιαμόρφωση της φυσιολογικής μορφολογίας του σπειράματος, είτε να επουλωθούν καταλείποντας ίνωση και προκαλώντας έτσι μη αναστρέψιμη νεφρική βλάβη. Διαμεσοσωληναριακή βλάβη και ίνωση μπορούν επίσης να συνοδεύουν τη ΣΝ και μπορεί να παίζουν ρόλο στη πρόγνωση. Επιπλέον, εκτιμάται η μορφολογία των αρτηριακών κλάδων (αρτηριόλια, μεσολοβίδες και τοξοειδείς αρτηρίες) με την παρουσία υαλίνωσης και πάχυνσης του έσω χιτώνα.



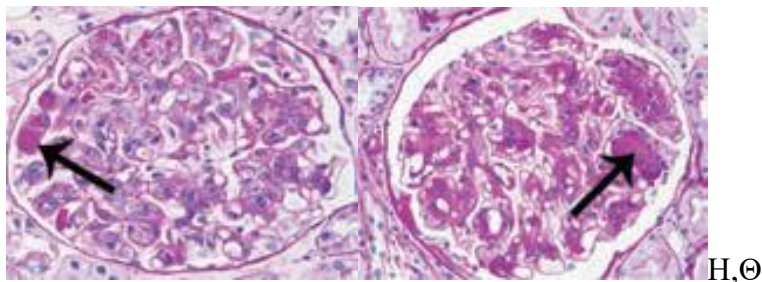
A,B



Γ,Δ



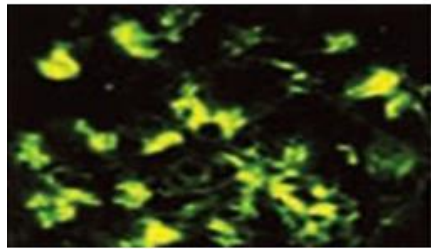
E,Z



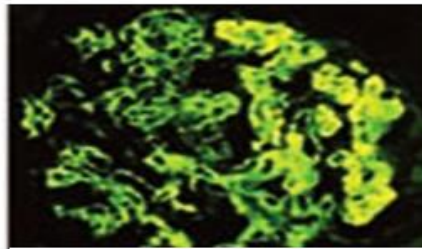
**Εικόνα 7:** Α. Φυσιολογικό σπείραμα με λεπτή ΣΒΜ, λίγη μεσαγγειακή ουσία και φυσιολογική κυτταροβρίθεια. Β. Μembranώδης ΣΝ, με πάχυνση των ΣΒΜ σε σύγκριση με το φυσιολογικό και φυσιολογική κυτταροβρίθεια. Γ. Μεταλοιδώδης ΣΝ, οξεία διάχυτη υπερπλαστική ΣΝ με σφαιρική ενδοτριχοειδική υπερπλασία, συμπεριλαμβανομένου ουδετερόφιλα στις τριχοειδικές αγκύλες, Δ. FSGS με περιπυλαίου τύπου τμηματική σκλήρυνση. Ε. Διάχυτη υπερπλαστική ΣΝ με σφαιρική ενδοτριχοειδική υπερπλασία και εξωτριχοειδική υπερπλασία (μνηοειδής σχηματισμός (βέλος). Ζ. ANCA-σχετιζόμενη νεκρωτική ΣΝ με κυτταρικό μνηοειδή σχηματισμό (βέλος) Η. κρυσφαριναιμική ΣΝ με ενδοτριχοειδική κυτταροβρίθεια και θρόμβους υαλίνης (βέλος) Θ. Διαβητική σπειραματοσκλήρυνση με σφαιρική αύξηση της μεσαγγειακής ουσίας και τμηματικούς όζους (βέλος). [τροποποιημένο από: Heptinstall's Pathology of the Kidney, 7E (2014)]

## 2. Μικροσκόπηση με ανοσοφθορισμό και ανοσοϋπεροξειδάση

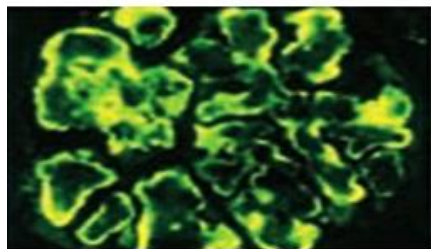
Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και η χρώση με ανοσοϋπεροξειδάση χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό ανοσιακών αντιδράσεων. Η εξέταση περιλαμβάνει τη χρώση για ανοσοσφαιρίνες IgG, IgA και IgM, για συστατικά του συμπληρώματος (C3, C4, C1q), για ινική και για κ και λ αλυσίδες. Ανοσοεναποθέσεις μπορεί να παρατηρηθούν κατά μήκος των αγκυλών των τριχοειδών ή στο μεσάγγειο. Αυτές μπορεί να είναι συνεχείς (γραμμικές) (όπως στην anti-GBM νόσο, στη νόσο εναπόθεσης μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών, στην ινδιακή σπειραματονεφρίτιδα) ή ασυνεχείς (κοκκώδεις) (όπως στη IgA νεφροπάθεια, στη μεμβρανώδη, στη μεμβρανοϋπερπλαστική, στη νεφρίτιδα του ΣΕΛ) σε όλο το μήκος του τριχοειδικού τοιχώματος ή του μεσαγγείου. Επιπλέον, ο έλεγχος για anti-PLA2R πραγματοποιείται σε μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια.



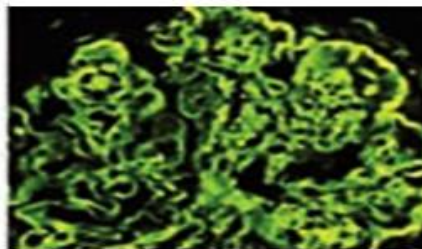
Μεσαγγειοπερπλαστική ΣΝ (IgA)



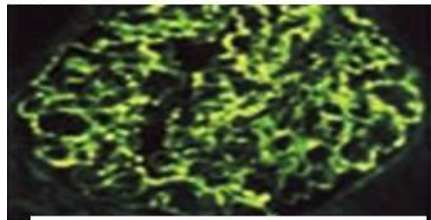
Υπερπλαστική ΣΝ (IgG)



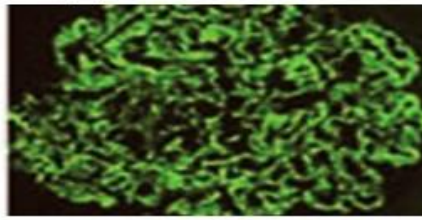
Τύπος I Μεμβρανοπερπλαστική ΣΝ (C3)



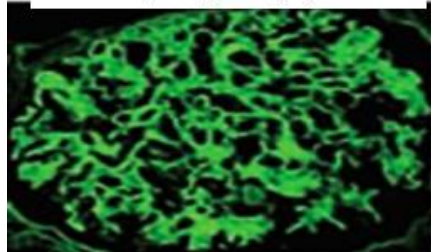
Τύπος II Μεμβρανοπερπλαστική ΣΝ (C3)



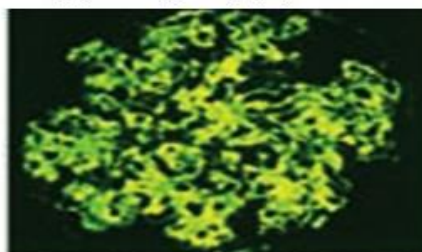
Μεταλοιμώδης ΣΝ (C3)



Μεμβρανώδης ΣΠ (IgG)



Anti-GBM ΣΝ (IgG)

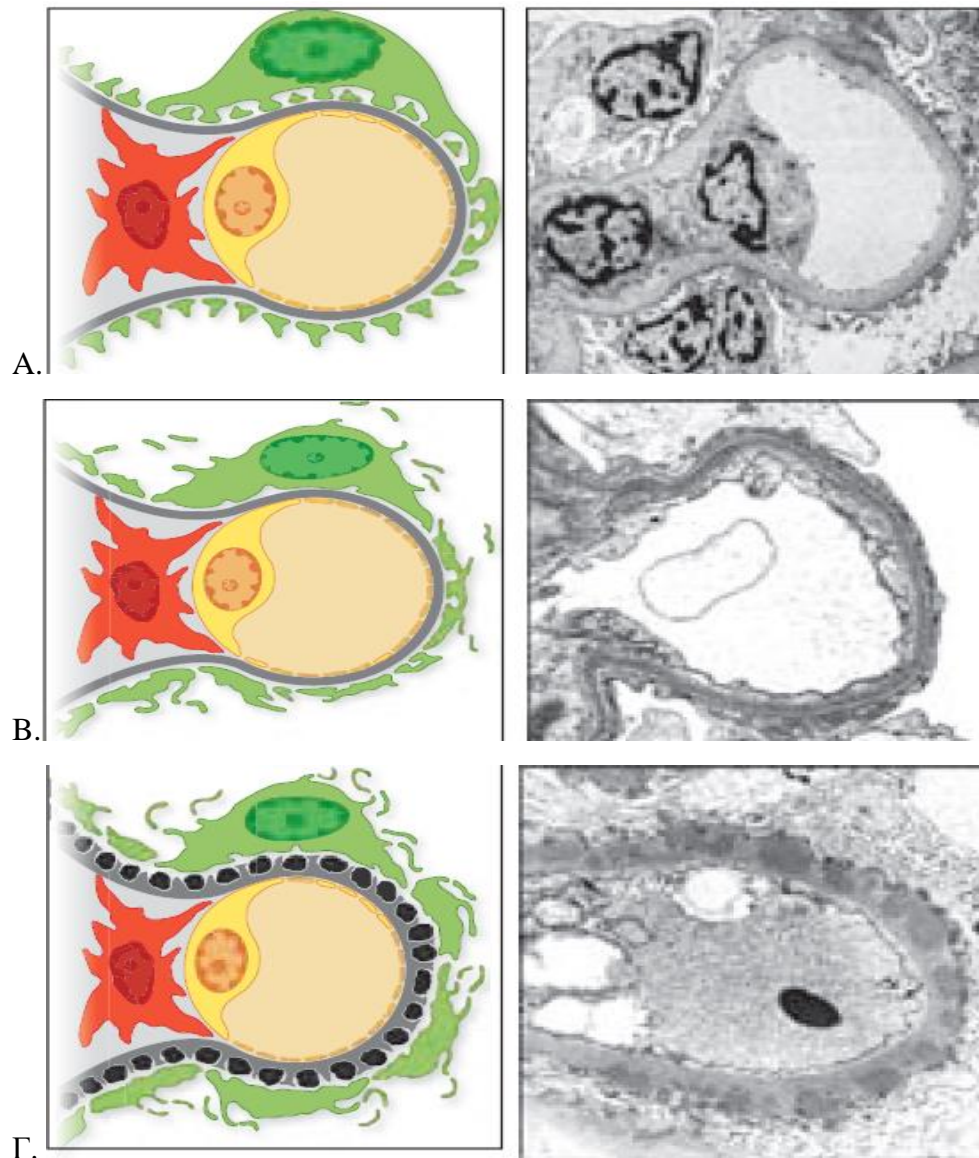


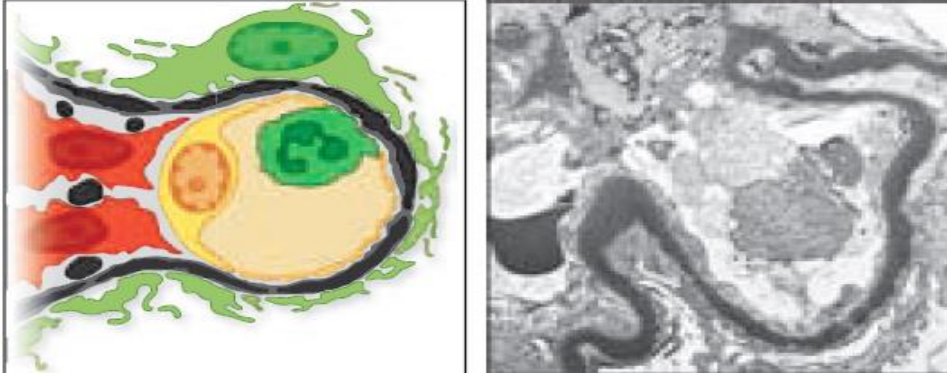
Ινδιακή ΣΠ (IgG)

**Εικόνα 8:** Το πρότυπο του ανοσοφθορισμού στην IgA νεφροπάθεια είναι μεσαγγειακός, στη νεφρίτιδα του λύκου κοκκώδης μεσαγγειακός και στις τριχοειδικές αγκύλες, στη ΜΥΣΝ τύπου I κοκκώδης περιφερικά στο τοίχωμα των τριχοειδών, στην ΜΥΣΝ τύπου II με μορφή γιρλάντας στο τοίχωμα των τριχοειδών και κοκκώδης στο μεσάγγειο, ακανόνιστες εναποθέσεις στο μεσάγγειο στη μεταστρεπτοκοκκική ΣΝ, κοκκώδης κατά μήκος των τριχοειδικών αγκυλών στη μεμβρανώδη, γραμμικός στη ΣΒΜ στη anti-GBM Νεφρίτιδα, κοκκώδης στην ινδιακή ΣΝ. [τροποποιημένο από: Heptinstall's Pathology of the Kidney, 7E (2014)]

### 3. Ηλεκτρονική μικροσκόπηση

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αναγνωρίζει διαταραχές της σπειραματικής μεμβράνης (όπως σύνδρομο Alport, νόσος λεπτής μεμβράνης), την υπάρξη ινιδίων (όπως στην αμυλοείδωση, ινιδιακή σπειραματονεφρίτιδα), καθώς και δικτυοσωληναριακές ενδοκυττάρια δομές (στη νεφρίτιδα του ΣΕΛ). Επίσης, είναι χρήσιμο για τον εντοπισμό των ανοσοεναποθέσεων υποεπιθηλιακά, υπενδοθηλιακά ή/και μεσαγγειακά όπως και την μορφολογία τους πυκνές, ομοιογενείς (νόσος πυκνών εναποθέσεων) ή διακριτές (C3 σπειραματονεφρίτιδα, μεμβρανοϋπερπλαστική επαγόμενη από ανοσοσφαιρίνες). Επιπλέον, αναγνωρίζει πιο σπάνιες νόσους όπως νόσος Fabry με τα γλυκοσφιγγολιπίδια στα σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα.





Δ.

**Εικόνα 9:** Α. Φυσιολογικό σπείραμα με ποδοκύτταρα (πράσινο) με φυσιολογικές ποδοειδείς προσεκβολές, φυσιολογικό πάχος ΣΒΜ (σκούρο γκρι), θυριδωτό ενδοθήλιο (κίτρινο), μεσαγγειακά κύτταρα (κόκκινο) και μεσαγγειακή ουσία (ανοιχτό γκρι) Β. Νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων με πλήρη εξάλειψη των ποδοειδών προσεκβολών. Γ. Μembranώδης σπειραματοπάθεια (στάδιο ΙΙ) με υποεπιθηλιακές πυκνές εναποθέσεις με προσεκβολές της ΣΒΜ και εξάλειψη των ποδοειδών προσεκβολών. Δ. Νόσος πυκνών εναποθέσεων με διαμεμβρανικές πυκνές εναποθέσεις, όπως και μεσαγγειακές. [τροποποιημένο από: Heptinstall's Pathology of the Kidney, 7E (2014)]

## **4. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ**

Ιστολογικά πρότυπα σπειραματικής βλάβης με βάση το οπτικό μικροσκόπιο αποτελούν τα παρακάτω [16]:

1. Απουσία αλλοιώσεων στο φωτονικό μικροσκόπιο
2. Μεμβρανώδες πρότυπο χωρίς κυτταροβρίθεια ή μεσαγγειακή υπερπλασία
3. Μεμβρανώδες πρότυπο με μεσαγγειακή υπερπλασία με λίγη/ή χωρίς κυτταροβρίθεια
4. Εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση χωρίς κυτταροβρίθεια
5. Μεσαγγειακή ή ενδοτριχοειδική υπερπλασία
6. Εξωτριχοειδική υπερπλασία
7. Μεμβρανοϋπερπλαστικό πρότυπο

### **4.1. Απουσία αλλοιώσεων στο οπτικό μικροσκόπιο**

Η νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων αποτελεί παράδειγμα σε αυτή την κατηγορία, όταν συνοδεύεται από νεφρωσικό σύνδρομο, ενώ όταν συνοδεύεται από μικροσκοπική αιματοουρία πρόκειται πιθανόν για τη νόσο λεπτής μεμβράνης. Επίσης απουσία αλλοιώσεων στο οπτικό μικροσκόπιο μπορεί να βρούμε σε αρχόμενο στάδιο κάποιας από τις υπόλοιπες σπειραματικές παθήσεις, όπως IgA Νεφροπάθεια, μεμβρανώδη, νεφρίτιδα του λύκου τάξης I, αμυλοείδωση και τότε η διαφορική διάγνωση θα γίνει με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά και τα ευρήματα από τον ανοσοφθορισμό και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

#### **4.1.1 Νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων**

Αποτελεί την κύρια αιτία νεφρωσικού συνδρόμου στα παιδιά (περίπου στο 90%) και πολύ λιγότερο στους ενήλικες (περίπου 10%) με αυξημένη συχνότητα στους υπερήλικες. Οι ασθενείς χαρακτηριστικά εμφανίζουν αιφνίδιο οίδημα που αναπτύσσεται σε διάστημα ημερών έως εβδομάδων, συχνά ακολουθούμενο από μια λοίμωξη αναπνευστικού ή συστηματική λοίμωξη. Παρουσιάζουν νεφρωσικό σύνδρομο με μαζική πρωτεϊνουρία (συχνά εκλεκτική αλβουμινουρία). Από τα λοιπά κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά παρουσιάζουν: 20-25% μικροσκοπική

αιματοουρία, 20-40% επηρεασμένη νεφρική λειτουργία κατά τη διάγνωση και 43% υπέρταση [17,18].

Στο οπτικό μικροσκόπιο, το σπείραμα εμφανίζεται φυσιολογικό, χωρίς παρουσία συμπληρώματος ή ανοσοεναποθέσεις στον ανοσοφθορισμό. Χαρακτηριστικό αποτελεί η εξάλειψη των ποδοειδών προσεκβολών η οποία είναι εμφανής στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [19].

Οι ασθενείς με ΝΕΑ αρκετά συχνά παρουσιάζουν πλήρη ύφεση (περίπου 85-90%) αλλά αρκετά συχνά παρουσιάζουν έστω και ένα επεισόδιο υποτροπής (50-75%). Παρόλου που στην αρχή σε αρκετούς ασθενείς παρατηρείται επηρεασμένη νεφρική λειτουργία, πρόκειται κυρίως για μια λειτουργική βλάβη, η οποία υποστρέφει με την ύφεση του νεφρωσικού, ύστερα και από πολλές υποτροπές της νόσου. Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου παρατηρείται σπάνια συνήθως στο 1% και πρόκειται για ασθενείς με κορτικοανθεκτικό νεφρωσικό σύνδρομο [20,21].

#### **4.2 Πάχυνση των βασικών μεμβρανών χωρίς κυτταροβρίθεια ή μεσαγγειακή υπερπλασία**

Στη συγκεκριμένη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται: η μεμβρανώδη πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής > στάδιο 1, η θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια με διεύρυνση του υπενδοθηλιακού χώρου, η προεκλαμψία/εκλαμψία με διόγκωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και η ινιδιακή σπειραματονεφρίτιδα με κυρίαρχες εναποθέσεις στο τοίχωμα των τριχοειδών. Η πάχυνση των σπειραματικών αγκυλών οφείλεται στην εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στην εξωτερική (υποεπιθηλιακή) επιφάνεια (μεμβρανώδες πρότυπο).

##### **4.2.1. Ιδιοπαθής Μεμβρανώδης Σπειραματοπάθεια**

Η μεμβρανώδης αποτελεί το αίτιο στο 20-30% του νεφρωσικού συνδρόμου στους ενήλικες στην Καυκάσια φυλή [22]. Η ιδιοπαθής είναι πιο συχνή σε άντρες άνω των 40, ενώ σπάνια ανευρίσκεται σε παιδιά, όπου συνήθως σχετίζεται με HBV ή λιγότερο συχνά με αυτοάνοσα νοσήματα. Στο 75% είναι ιδιοπαθής, ενώ στο υπόλοιπο 25% σχετίζεται με δευτεροπαθή αίτια, όπως ΣΕΛ, κακοήθεια,



λοιμώξεις, φάρμακα [23]. Κυρίως εμφανίζεται με νεφρωσικό σύνδρομο, το οποίο έχει προοδευτική πορεία μέσα σε μήνες. Από τα λοιπά κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά παρουσιάζουν: 50% μικροσκοπική αιματουρία χωρίς ερυθροκυτταρικούς κυλίνδρους, 20% υπονεφρωσικού εύρους πρωτεϊνουρία, 70% έχει φυσιολογική αρτηριακή πίεση και νεφρική λειτουργία κατά τη διάγνωση. [24].

Η χαρακτηριστική βλάβη στο οπτικό μικροσκόπιο είναι η διάχυτη πάχυνση της ΣΒΜ, με την απουσία κυτταροβρίθειας. Σε αρχικό στάδιο μπορεί το σπείραμα να εμφανίζεται φυσιολογικό, ενώ αργότερα μπορεί να διαπιστωθούν πρώιμες προεξοχές της ΣΒΜ μεταξύ των εναποθέσεων, με την χαρακτηριστική εικόνα των αιχμών «spikes». Σε πιο χρόνιο στάδιο ανευρίσκονται χρόνιες σκληρυντικές αλλοιώσεις του σπειράματος, καθώς και διαμεσοσωληναριακές βλάβες. Ο ανοσοφθορισμός αποκαλύπτει διάχυτη κοκκώδη χρώση της IgG και C3 κατά μήκος της ΣΒΜ. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αναγνωρίζονται οι χαρακτηριστικές πυκνές υποεπιθηλιακές εναποθέσεις και χωρίζονται σε 4 ιστολογικά στάδια (Ehrenreich-Churg) αναλόγως το βαθμό που προσβάλλουν οι εναποθέσεις τη ΣΒΜ [25].

Ασθενείς με αυτόματη ύφεση (25-30%) που θα εμφανίζουν αυτόματη ύφεση θα έχουν γενικά καλή πρόγνωση. 30-40% των ασθενών που θα λάβει ανοσοκατασταλτική θεραπεία θα παρουσιάσει πλήρη ύφεση και το 30-50% θα παρουσιάσει μερική ύφεση. Αυτοί που παρουσιάζουν πλήρη ή μερική ύφεση έχουν πολύ καλή νεφρική πρόγνωση, ενώ το 50% από τους υπόλοιπους καταλήγει σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Παράγοντες εξέλιξης αποτελούν: μεγαλύτερη ηλικία, πρωτεϊνουρία >8γρ/24ώρο κατά τη διάγνωση και εμμένουσα πρωτεϊνουρία στους 6 μήνες, επηρεασμένη νεφρική λειτουργία κατά τη διάγνωση, ο υψηλός τίτλος στον ορό anti-PLA2R και από τα ιστολογικά στοιχεία η εστιακή τμηματική σπειραματοσκληρυνση και η διαμεσοσωληναριακή ίνωση [27-28].

#### **4.3. Πάγυνση βασικών μεμβρανών με μεσαγγειακή υπερπλασία με λίγη/ή χωρίς κυτταροβρίθεια**

Στη συγκεκριμένη κατηγορία περιλαμβάνονται: η διαβητική σπειραματοπάθεια, δευτεροπαθής μεμβρανώδης, αμυλοείδωση, νόσος εναπόθεσης μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης, ινιδιακή σπειραματονεφρίτιδα, C3 σπειραματοπάθεια.

#### **4.4. Εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση χωρίς κυτταροβρίθεια**

Στη συγκεκριμένη κατηγορία ανήκουν η εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής), κάθε χρόνια σκληρυντική φάση εστιακής σπειραματονεφρίτιδας και το σύνδρομο Alport. Η σκλήρυνση αποτελεί εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας, η οποία διευρύνει το μεσάγγειο αποφράσσοντας αυλούς τριχοειδών ή σχηματίζοντας συμφύσεις με τη κάψα του Bowman.

##### **4.4.1 Εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση**

Αποτελεί μια ιστολογική μορφή σπειραματικής βλάβης, που περιλαμβάνει μία ποικιλία κλινικοπαθολογικών συνδρόμων και μπορεί να είναι ιδιοπαθής ή δευτεροπαθής. Αποτελεί συχνό αίτιο νεφρωσικού συνδρόμου και καταλαμβάνει το 35% στις ΗΠΑ [29]. Ασθενείς με πρωτοπαθή ΕΤΣΣ συνήθως εμφανίζονται με οξεία εμφάνιση νεφρωσικού συνδρόμου και το 25-50% παρουσιάζει ήδη επηρεασμένη νεφρική λειτουργία. Επίσης το 40-50% παρουσιάζει υπέρταση, ενώ το 40% μικροσκοπική αιματουρία [30].

Υπάρχουν ιστολογικοί τύποι με βάση το οπτικό μικροσκόπιο οι οποίοι διακρίνονται σύμφωνα με τη **Columbia ταξινόμηση** σε: 1.ΕΤΣΣ που δεν μπορεί να οριστεί διαφορετικά 2. Περιτυλαία ΕΤΣΣ (κυρίως 2παθή αίτια) 3. Κυτταρική μορφή 4. Καταρροϊκή μορφή 5. Κορυφαία. Αν και η μορφολογία αλλάζει στις παραπάνω ιστολογικές τάξεις, σε όλες ανευρίσκονται διάχυτη (>80%)

εξάλειψη των ποδοειδών προσεκβολών και υπερτροφία των ποδοκυττάρων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [31].

Συνήθως το 70% ανταποκρίνεται στη θεραπεία, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό υποτροπιάζει μέχρι και το 50% των ασθενών που βρίσκονται σε μερική ύφεση. Η μη θεραπευθείσα ΕΤΣΣ καταλήγει σε χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου στο 50% σε 5-8 χρόνια. Οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου 5-20 έτη μετά τη πρώτη προσβολή, με το 50% από αυτούς να φτάνει σε τελικό στάδιο σε 10 έτη. Παράγοντες που επηρεάζουν τη πρόγνωση αποτελούν η απάντηση στη θεραπεία, ο βαθμός της πρωτεϊνουρίας και της νεφρικής βλάβης κατά τη διάγνωση και ιστολογικά στοιχεία (η διαμεσοσωληναριακή ίνωση και η καταρροϊκή μορφή αποτελούν αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες). Ο πιο σημαντικός αποτελεί η απάντηση στη θεραπεία και η ύφεση της λευκωματουρίας [32-34].

#### **4.5 Μεσαγγειακή υπερπλασία**

Η σπειραματική βλάβη αποτελείται από αύξηση της μεσαγγειακής κυτταροβρίθειας (>3 πυρήνες) εντός της ουσίας ενός περιφερικού μεσαγγειακού τμήματος. Στη συγκεκριμένη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται: IgA νεφροπάθεια, νεφρίτιδα του λύκου τάξης II, οξεία μεταλοϊμώδης, C3 σπειραματοπάθεια.

##### **4.5.1 IgA Νεφροπάθεια**

Αποτελεί την πιο συχνή μορφή σπειραματονεφρίτιδας. Μπορεί να εμφανιστεί σε όλες τις ηλικίες με αιχμή τη δεύτερη και τρίτη δεκαετία. Πιο συχνά εμφανίζεται με μακροσκοπική αιματουρία, συνήθως μετά από λοίμωξη αναπνευστικού ή γαστρεντερικού. Το 30-40% εμφανίζεται με μικροσκοπική αιματουρία και ήπια πρωτεϊνουρία, ενώ μόνο το 10% με νεφρωσικό σύνδρομο [35,36].

Το παθολογικό ιστολογικό χαρακτηριστικό στον ανοσοφθορισμό αποτελεί η κυρίαρχη ή συγκυρίαρχη καθήλωση της IgA στο μεσάγγειο. Η παθολογική ταξινόμηση της IgA Νεφροπάθειας καθορίζεται από το MEST-C score (Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society) το οποίο αποτελείται: (M) μεσαγγειακή υπερπλασία (E) ενδοτριχοειδική υπερπλασία, (S), τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, (T) σωληναριακή ατροφία/διάμεση ίνωση, (C) μηνοειδείς σχηματισμοί. Το ιστολογικό score μαζί με τα κλινικά χαρακτηριστικά παρέχουν προγνωστική αξία [37,38].

Ασθενείς με λίγη ή καθόλου πρωτεϊνουρία έχουν χαμηλό κίνδυνο εξέλιξης. Παρόλο αυτά προοδευτική πρωτεϊνουρία και νεφρική ανεπάρκεια αναπτύσσεται σε κάποιους ασθενείς μετά από κάποιο διάστημα. Από τους ασθενείς που αναπτύσσουν πρωτεϊνουρία ή/ και νεφρική ανεπάρκεια προχωρούν σε χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου σε 10 χρόνια το 15-25% και σε 20 χρόνια το 20-30%. Από τα κλινικά χαρακτηριστικά αρνητική προγνωστική αξία έχουν η επηρεασμένη νεφρική λειτουργία, η υπέρταση και η εμμένουσα πρωτεϊνουρία >1γρ/24ώρο πάνω από 6 μήνες. Όσον αφορά τα ιστολογικά κριτήρια η μεσαγγειακή υπερπλασία, η τμηματική σπειραματοσκλήρυνση και η σωληναριακή ατροφία/διάμεση ίνωση χρησιμοποιούνται σε ένα προγνωστικό score που προβλέπει το 5ετή κίνδυνο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου [38,39].

#### **4.6 Πάχυνση των βασικών μεμβρανών με κυτταροβρίθεια**

Αποτελεί η μεσαγγειακή και/ ή ενδοτριχοειδής υπερπλασία μαζί με την πάχυνση των τοιχωμάτων των τριχοειδών λόγω υπενδοθηλιακών ανοσοσφαιρινών και/ή παραγόντων συμπληρώματος. Περιλαμβάνει την μεμβρανοϋπερπλαστική μεσολαβούμενη από ανοσοσφαιρίνες και τη μεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα, τη μεταλοιμώδη και τη νεφρίτιδα του λύκου τάξης III, IV.

#### **4.6.1 Μεμβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα**

Η μεμβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα χαρακτηρίζεται στο οπτικό μικροσκόπιο από κυτταροβρίθεια, μεσαγγειακή υπερπλασία και εικόνα διπλής παρυφής της ΣΒΜ. Η πάχυνση της ΣΒΜ οφείλεται στην εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων ή παραγόντων του συμπληρώματος, ενώ η μεσαγγειακή και η υπενδοθηλιακή κυτταροβρίθεια προκαλεί λοβώδη μορφολογία στο σπείραμα. Αναλόγως την παθογένεια χωρίζεται σε 2 κατηγορίες την μεμβρανοϋπερπλαστική μεσολαβούμενη από ανοσοσφαιρίνες και τη μεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα [40].

Η μεμβρανοϋπερπλαστική ΣΝ δεν είναι συχνή αιτία σπειραματικής νόσου. Οι ασθενείς παρουσιάζονται με μικροσκοπική αιματοουρία με δύσμορφα ερυθρά και μη νεφρωσικού εύρους πρωτεϊνουρία (35%), με νεφρωσικό σύνδρομο και ήπια επηρεασμένη νεφρική λειτουργία (35%) ή ως ΤΕΣΝ (10%). Το 50-80% εμφανίζουν υπέρταση κατά τη διάγνωση. Η υποσυμπληρωματιαιμία είναι αρκετά συχνή σε όλους τους τύπους.

Οι ασθενείς που εμφανίζονται με μη νεφρωσικού εύρους πρωτεϊνουρία, φυσιολογική νεφρική λειτουργία και χωρίς υπέρταση έχουν καλή πρόγνωση. Αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες κατά τη διάγνωση αποτελούν το νεφρωσικό σύνδρομο, η επηρεασμένη νεφρική λειτουργία και η υπέρταση από τα κλινικά χαρακτηριστικά, ενώ από τα ιστολογικά οι μηνοειδείς σχηματισμοί και η διάμεση ίνωση/σωληναριακή ατροφία [41,42].

#### **4.6.2 Μεμβρανοϋπερπλαστική τάξη III/IV του λύκου**

Η νεφρική προσβολή στο ΣΕΛ είναι αρκετά συχνή. Κλινικά εμφανής νεφρική νόσος εμφανίζεται στο 1/3 των ασθενών. Το πιο συχνό κλινικό χαρακτηριστικό αποτελεί η πρωτεϊνουρία με το 45-65% να εμφανίζει νεφρωσικό σύνδρομο. Συχνά εμφανίζουν και μικροσκοπική αιματοουρία ή αύξηση της κρεατινίνης [43].

Υπάρχουν 6 ιστολογικοί τύποι με βάση την σπειραματική βλάβη κατά την ταξινόμηση ISN/RPS 2004. Τάξης I ήπια μεσαγγειακή, τάξης II μεσαγγειοϋπερπλαστική, τάξης III εστιακή

υπερπλαστική, τάξης IV διάχυτη υπερπλαστική, τάξης V μεμβρανώδης, τάξης VI σκληρυντική. Οι τάξεις III/IV χαρακτηρίζονται από τμηματική ή γενικευμένη ενδοτριχοειδική ή εξωτριχοειδική σπειραματονεφρίτιδα και χαρακτηρίζονται από υπενδοθηλιακές εναποθέσεις [44].

Παράγοντες εξέλιξης της νεφρικής νόσου αποτελούν η μη έγκαιρη έναρξη θεραπείας, η αυξημένη κρεατινίνη κατά τη διάγνωση, η μη ύφεση της νόσου, οι υποτροπές, ο δείκτης χρονιότητας στη βιοψία νεφρού >3 (σπειραματοσκλήρυνση, διάμεση ίνωση, σωληναριακή ατροφία) και ο δείκτης ενεργότητας >12 (ενδοτριχοειδική υπερπλασία, καρυορρηξία/ινιδοειδής νέκρωση, διάσπαση της ΣΒΜ, κυτταρικοί μηνοειδείς, υπενδοθηλιακές εναποθέσεις). Τελικά το 10% των ασθενών με ΣΕΛ καταλήγουν σε χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου [45,46].

#### **4.7 Εξωτριχοειδής υπερπλασία**

Αποτελεί σοβαρή σπειραματική βλάβη και περιλαμβάνει τη βλάβη στα κύτταρα έξω από τις τριχοειδείς αγκύλες (ποδοκύτταρα, τοιχωματικά κύτταρα). Οι διασπάσεις στη ΣΒΜ επιτρέπουν στην ινική και σε κυτταρικά στοιχεία να εξέλθουν στη βωμάνεια κοιλότητα και να διεγείρουν τη δημιουργία μηνοειδούς σχηματισμού. Περιλαμβάνονται: η ANCA-σχετιζόμενη σπειραματονεφρίτιδα (χωρίς καθήλωση ανοσοσυμπλεγμάτων σε ΑΦ), η anti-GBM Νεφρίτιδα (γραμμική εναπόθεση Ig σε ΑΦ) και η ανοσοσυμπλεγματική μηνοειδική ΣΝ (ΣΕΛ, IgA αγγειίτιδα, κρυσφαιριναιμική).

##### **4.7.1 ANCA-σχετιζόμενη ΣΝ**

Η ANCA σχετιζόμενη αγγειίτιδα προσβάλλει κυρίως ασθενείς κατά την 5η, 6η, 7η δεκαετία ζωής. Περιλαμβάνει την κοκκιωμάτωση με πολυαγγειίτιδα, την μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα και τη Churg-Strauss. Η νεφρική προσβολή είναι αρκετά συχνή στους 2 πρώτους τύπους (77-85% των ασθενών παρουσιάζουν νεφρική προσβολή μέσα στα 2 πρώτα χρόνια της διάγνωσης). Συνήθως οι ασθενείς εμφανίζονται με ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα με ενεργό ίζημα ούρων και ποικίλου βαθμού πρωτεϊνουρία (συνήθως υπονεφρωσικού εύρους) [47].

Το κύριο ιστολογικό χαρακτηριστικό αποτελεί η τμηματική ινδοειδής νέκρωση, συνήθως με την παρουσία μηνοειδών σχηματισμών (κυτταρικοί, ινοκυτταρικοί, ινώδεις). Επίσης χαρακτηρίζεται από καθόλου έως λίγες ανοσολογικές εναποθέσεις στον ανοσοφθορισμό και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Με βάση το οπτικό μικροσκόπιο καθορίζεται η ιστολογική κατάταξη σε 4 ομάδες: 1. εστιακή - Τουλάχιστον 50% των σπειραμάτων με φυσιολογική μορφολογία, 2. Μηνοειδική- τουλάχιστον το 50% των σπειραμάτων με μηνοειδείς σχηματισμούς, 3. Σκληρυντική - τουλάχιστον το 50% των σπειραμάτων με σφαιρική σπειραματοσκλήρυνση 4. Μικτή - <50% των σπειραμάτων με φυσιολογική μορφολογία, <50% των σπειραμάτων με μηνοειδείς σχηματισμούς, <50% των σπειραμάτων σφαιρικά σκληρυσμένα [48,49].

Η αυξημένη κρεατινίνη κατά τη διάγνωση, η μη ανταπόκριση στη θεραπεία επαγωγής, η υποτροπή και η ηλικία >65 έτη αποτελούν αρνητικούς προγνωστικούς δείκτες νεφρικής εξέλιξης, ενώ από τα ιστολογικά στοιχεία η εστιακή τάξη σχετίζεται με την καλύτερη νεφρική πρόγνωση στον 1ο και στον 5ο χρόνο, ενώ η σκληρυντική με τη χειρότερη. Το 10-26% των ασθενών καταλήγουν σε χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου, αναλόγως βέβαια τη διάρκεια της παρακολούθησης, όπως έχει φανεί σε διάφορες σειρές παρατήρησης [50,51].

## 5. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ

Οι περισσότερες μορφές πειραματικών παθήσεων είναι ανοσολογικά επαγόμενες [52,53], αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις ο αιτιολογικός παράγοντας παραμένει άγνωστος, εκτός από περιπτώσεις που σχετίζονται με λοιμώδεις παράγοντες, όπως η μεταστρεπτοκοκκική ΣΝ (β-αιμολυτικός στρεπτόκοκκος), η κρυσφαιριναιμική ΣΝ σχετιζόμενη με την ΗCV, ΣΝ σχετιζόμενη με φάρμακα και ΣΝ σχετιζόμενη με κακοήθεια.

Η νεφριτινογόνος ανοσοαπόκριση περιλαμβάνει τόσο τη χυμική, όσο και την κυτταρική ανοσία. Η **χυμική ανοσία** είναι το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των Β κυττάρων και των πλασματοκυττάρων από τα Τ-βοηθητικά κύτταρα 2 (T helper cell 2/ Th2), που οδηγούν στην εναπόθεση ανοσοσφαιρινών και στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος στο σπείραμα. Στην **κυτταρική ανοσία** τα Τ-βοηθητικά κύτταρα 1 (Th1) συμβάλλουν στη διήθηση του σπειράματος από κυκλοφορούντα μονοκύτταρα (μακροφάγα, λεμφοκύτταρα) και στον σχηματισμό των μηννοειδών σχηματισμών.

### 5.1 Χυμική Ανοσία

Οι περισσότερες ΣΝ χαρακτηρίζονται από τον σχηματισμό ανοσολογικών συμπλεγμάτων, τα οποία περιέχουν ανοσοσφαιρίνες και συστατικά του συμπληρώματος. Παραδείγματα αποτελούν η μεταλοιμώδης ΣΝ, IgA νεφροπάθεια, anti-GBM νεφρίτιδα, νεφρίτιδα του λύκου, μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια, μεμβρανοϋπερπλαστική ΣΝ μεσολαβούμενη από ανοσοσυμπλέγματα και πολλές μορφές ταχέως εξελισσόμενης ΣΝ. Οι ανοσοεναποθέσεις σχηματίζονται στο σπείραμα είτε ενεργά, όταν το αντιγόνο στόχος εντοπίζεται εντός του σπειράματος, είτε παθητικά, λόγω του ρόλου του σπειράματος στη διήθηση.

Αντισώματα που επάγουν πειραματικές ανοσοεναποθέσεις κατευθύνονται έναντι των ακολούθων αντιγόνων:



### **1. Φυσιολογικά συστατικά του σπειράματος**

Όπως στη νόσο Goodpasture αντιγόνο αποτελεί το καρβοξυτελικό άκρο του μη κολλαγονικού τμήματος (NCL) της α-3 αλυσού του κολλαγόνου τύπου IV, α3(IV)NCL [54,55], στη μεμβρανώδη ΣΝ αντιγόνο αποτελεί ο υποδοχέας της φωσφολιπάσης A2 (PLA2R) και η θρομβοσπονδίνη -1 (THSD7A) στα ποδοκύτταρα [56,57].

### **2. Μη νεφρικής προέλευσης αυτο-αντιγόνα εντοπιζόμενα στο σπείραμα**

Όπως τα DNA νουκλεοτιδικά ανοσοσυμπλέγματα στη νεφρίτιδα του λύκου ή η παθολογικά γλυκοζυλιωμένη IgA στην IgA νεφροπάθεια [58,59]. Αυτά τα μη σπειραματικά αντιγόνα εντοπίζονται στο σπείραμα λόγω παθητικής παγίδευσης, είτε λόγω αυτόματης συσσωμάτωσης, είτε λόγω αλληλεπίδρασης με αρνητικά φορτισμένες περιοχές των τριχοειδών του σπειραμάτων. Επίσης μπορούν να συνδεθούν με υποδοχείς στο μεσάγγειο (υποδοχέας τρανσφερίνης στη IgA νεφροπάθεια). Τα αντιγόνα αυτά μπορεί να είναι μόνα τους και να συνδέονται ακολούθως με αντισώματα για σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων (in situ immune complex formation), ή μπορεί να παγιδεύονται παθητικά ως στοιχεία ανοσοσυμπλεγμάτων που έχουν σχηματιστεί στην κυκλοφορία.

### **3. Εξωγενή αντιγόνα ή ανοσοσυμπλέγματα**

Όπως κρυσφαιρίνες περιέχουσες HCV αντιγόνα, στην HCV σχετιζόμενη μεμβρανοϋπερπλαστική ΣΝ. Αυτά εντοπίζονται στο σπείραμα, λόγω συγγένειας φορτίου, ή παθητικής παγίδευσης, ή τοπικής κατακρήμνισης μακρομορίων [60,61].

Η χυμική ανοσία ενός συγκεκριμένου αντιγόνου-στόχου δεν σημαίνει απαραίτητα παθογένεια, καθώς αντισώματα έναντι της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO), της πρωτεΐνάσης 3 (PR3) μπορεί να βρεθούν σε ασυμπτωματικούς ασθενείς και τα PLA2R αντισώματα μπορεί να προϋπάρχουν της MN μήνες ή και χρόνια [62,63].

## **5.2 Κυτταρική Ανοσία**

Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μονοκύτταρα, ειδικά τα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα μπορούν να προκαλέσουν σπειραματική βλάβη, εν τη απουσία ανοσοεναποθέσεων, όπως νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων (NEA), εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (ΕΤΣΣ) και ΤΕΣΝ[64].

## **5.3 Ανοσολογικοί Μηχανισμοί**

Υπάρχουν 2 ανοσολογικοί μηχανισμοί σπειραματικής βλάβης: 1. φλεγμονώδης και 2. μη φλεγμονώδης [52].

### **1. Φλεγμονώδης βλάβη (σπειραματονεφρίτιδα ΣΝ)**

Χαρακτηρίζεται από αύξηση της σπειραματικής κυτταροβρίθειας εξαιτίας της παρουσίας αιμοποιητικών κυττάρων, όπως ουδετερόφιλα και μακροφάγα που διηθούν το σπείραμα και/ή σπειραματικών κυττάρων που υφίστανται υπερπλασία. Τα εκτελεστικά αυτά κύτταρα μπορούν να επάγουν βλάβες όπως θρόμβωση, νέκρωση, και μηννοειδείς σχηματισμούς. Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά της φλεγμονώδους σπειραματικής βλάβης αποτελούν: η αιματουρία με δύσμορφα ερυθρά με ή χωρίς ερυθροκυτταρικούς κυλίνδρους, ποικίλη πρωτεϊνουρία (ήπια έως και νεφρωσικό σύνδρομο) και φυσιολογική ή/και επηρεασμένη νεφρική λειτουργία (αναλόγως της βαρύτητας της νόσου).

### **2. Μη φλεγμονώδη βλάβη**

Η οποία έχει ως κύριο στόχο το ποδοκύτταρο και σχετίζεται με λειτουργική βλάβη στο σπείραμα, η οποία οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα στην αλβουμίνη και σε άλλες πρωτεΐνες. Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά αποτελούν: η πρωτεϊνουρία και το νεφρωσικό σύνδρομο με λίγη ή καθόλου αιματουρία, χωρίς ερυθροκυτταρικούς κυλίνδρους και κύρια παραδείγματα αποτελούν τα εξής: νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων (NEA), μεμβρανώδη (MN) και η εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (ΕΤΣΣ). Αυτές οι μορφές χαρακτηρίζονται από αυξημένη διαπερατότητα, λόγω πρωταρχικής βλάβης στο ποδοκύτταρο και ονομάζονται ποδοκυττοπάθειες.

### **5.3.1 Σημασία της σπειραματικής βλάβης**

Η περιοχή της σπειραματικής βλάβης, και ειδικά τα κύτταρα που στοχεύονται, καθορίζουν τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (σπειραματονεφρίτιδα με ενεργό ίζημα ούρων ή πρωτεϊνουρία με λίγη ή καθόλου αιματουρία).

Οι τύποι των κυττάρων που προσβάλλονται είναι: τα μεσαγγειακά, τα ενδοθηλιακά και τα επιθηλιακά (σπλαχνικά και τοιχωματικά).

1. **Τα ενδοθηλιακά και τα μεσαγγειακά κύτταρα** έρχονται σε επαφή με παράγοντες της κυκλοφορίας (όπως συμπλήρωμα) ή τα φλεγμονώδη κύτταρα (όπως ουδετερόφιλα, μακροφάγα, T κύτταρα). Τα ανοσοσυμπλέγματα που δημιουργούνται, εναποτίθενται στη μεσαγγειακή ουσία ή στον υπενδοθηλιακό χώρο και τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά αποτελούν την ΣΝ με αιματουρία με/ή χωρίς ερυθροκυτταρικούς κυλίνδρους και ποικίλη πρωτεϊνουρία.
2. **Τα σπλαχνικά επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα)** είναι πιο σημαντικός φραγμός στη σπειραματική διήθηση και περιορίζει τη διόδο αρνητικά φορτισμένων ή μεγάλων (>60 kDa) πρωτεϊνών. Δεδομένου ότι τα ποδοκύτταρα διαχωρίζονται από τη συστηματική κυκλοφορία από την σπειραματική βασική μεμβράνη, υπάρχει λίγη ή καθόλου ενεργοποίηση των κυκλοφορούντων φλεγμονωδών κυττάρων. Οι υποεπιθηλιακές ανοσοεναποθέσεις που στοχεύουν τα ποδοκύτταρα, προκαλούν μικρή ή και καθόλου αιματουρία, χωρίς ερυθροκυτταρικούς κυλίνδρους και πρωτεϊνουρία έως και νεφρωσικού εύρους. Στην ΤΕΣΝ, παρόλο που τα ποδοκύτταρα δεν είναι ο αρχικός στόχος, συμβάλλουν στη δημιουργία μηνοειδών σχηματισμών.
3. **Τα τοιχωματικά επιθηλιακά κύτταρα** καλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια της κάψας του Bowman και συμμετέχουν στο σχηματισμό μηνοειδών σχηματισμών. Επίσης έχει φανεί ότι μπορεί να συμβάλλουν στην αναπλήρωση κατεστραμμένων ποδοκυττάρων.

## **Άλλοι παράγοντες που καθορίζουν τη σπειραματική βλάβη:**

### **1. Μηχανισμός σχηματισμού των ανοσοεναποθέσεων**

Ο in situ μηχανισμός ανοσοσυμπλεγμάτων προκαλεί ενεργοποίηση του συμπληρώματος και αποτελεί πιο «νεφριτογόνο» από την παθητική παγίδευση ανοσοσυμπλεγμάτων της κυκλοφορίας [65].

### **2. Βιολογικές ιδιότητες των ανοσοσφαιρινών που συμμετέχουν στις ανοσοεναποθέσεις**

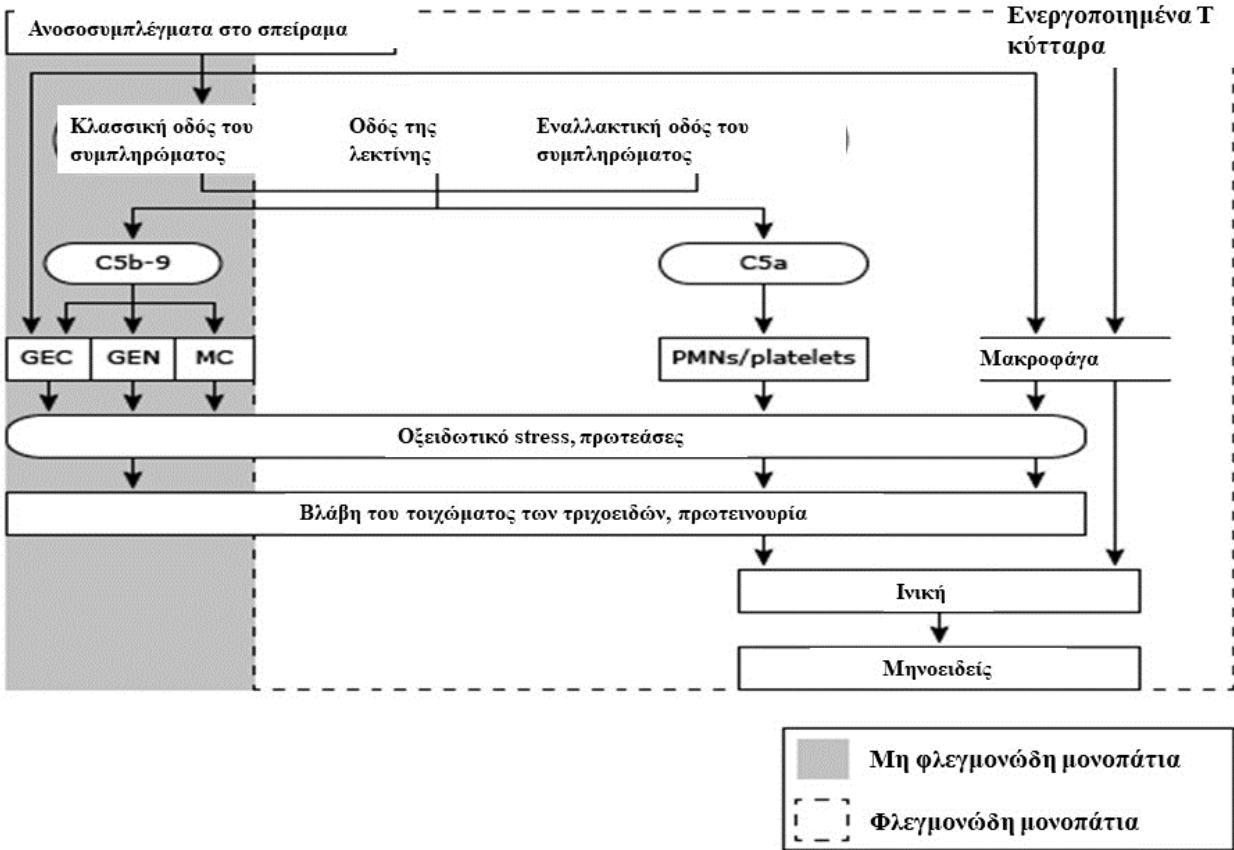
Από τους υπότυπους της IgG σφαιρίνης, οι IgG3 και IgG1 καθλώνουν έντονα το συμπλήρωμα και προκαλούν βαρύτερη σπειραματική βλάβη από τις ανοσοσφαιρίνες που ενεργοποιούν φτωχά ή λιγότερο έντονα το συμπλήρωμα (IgG4 ή IgA) [66].

### **3. Η ποσότητα των ανοσοσυμπλεγμάτων**

Η μεγαλύτερη ποσότητα ανοσοσυμπλεγμάτων προκαλεί μεγαλύτερη σπειραματική βλάβη.

Η σπειραματική βλάβη αποτελεί αποτέλεσμα ενεργοποίησης εκτελεστικών κυττάρων και της απελευθέρωσης ποικιλίας φλεγμονωδών μεσολαβητών [67].

1. Προϊόντα του συμπληρώματος (C5a, C5b-9) που επάγονται από αντισώματα.
2. Οξειδωτικοί παράγοντες και πρωτεάσες που απελευθερώνονται από φλεγμονώδη και εγγενή σπειραματικά κύτταρα.
3. Ποικίλες κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες και αγγειοδραστικοί παράγοντες

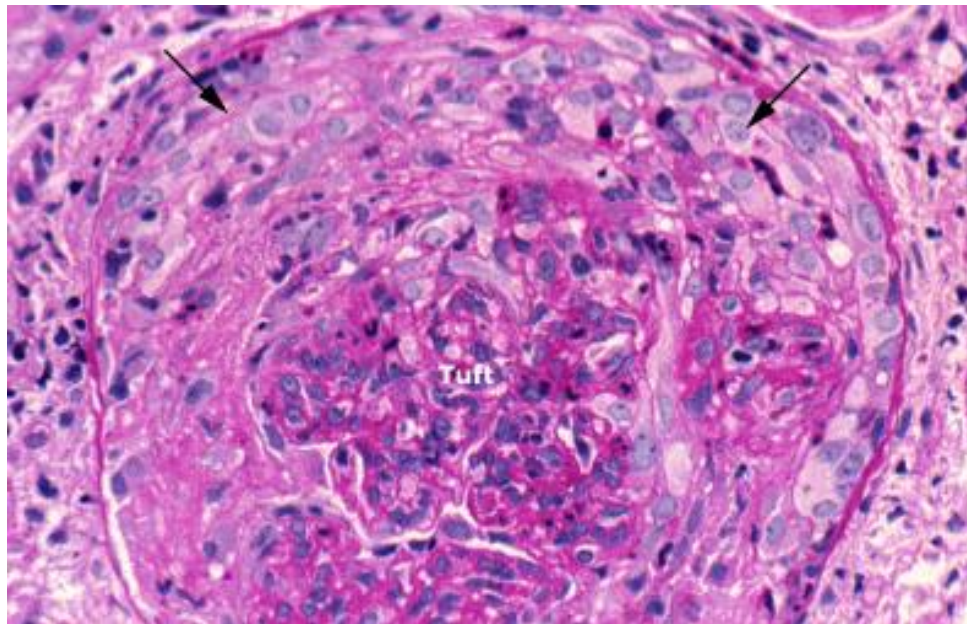


**Εικόνα 10:** Σπειραματική βλάβη-φλεγμονώδη μονοπάτια (τροποποιημένο από: DOI:10.1093/NDT/13.SUPPL\_1.10)

### 5.3.2 Φλεγμονώδεις Μηχανισμοί της Σπειραματικής Βλάβης

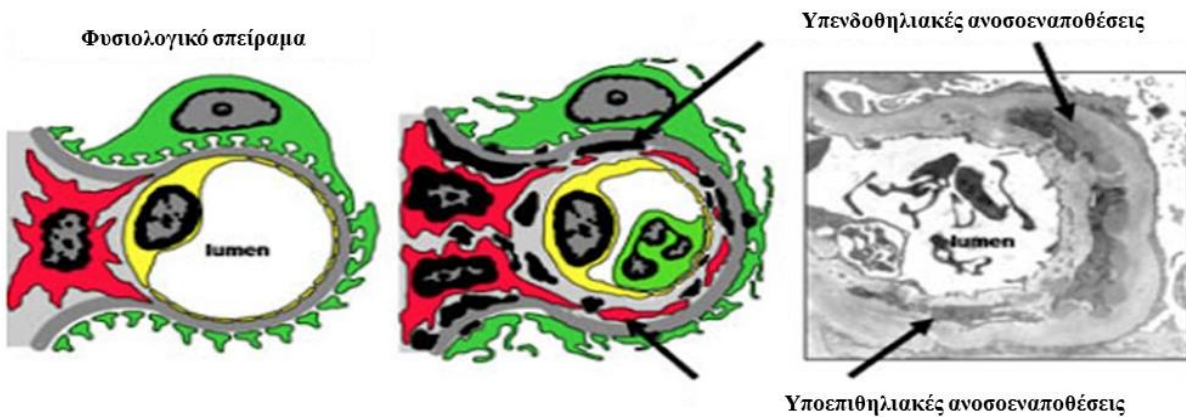
Όταν οι ανοσοεναποθέσεις δημιουργούνται στο σπείραμα επάγουν κυτταρική φλεγμονώδη απάντηση. Οι ανοσοεναποθέσεις μπορεί να παρατηρηθούν στη βασική μεμβράνη (anti-GBM σπειραματονεφρίτιδα), υπενδοθηλιακά (μεμβρανοϋπερπλαστική, νεφρίτιδα του λύκου III/IV) ή στο μεσάγγειο (IgA νεφροπάθεια, νεφρίτιδα του λύκου I/II). Οι υπενδοθηλιακές και οι μεσαγγειακές εναποθέσεις ενεργοποιούν πολλαπλές φλεγμονώδεις διεργασίες, όπως ενεργοποίηση του συμπληρώματος, προπηκτική δραστηριότητα, απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων και χημειοτακτικές δράσεις. Σοβαρή φλεγμονή μπορεί να συμβεί και σε απουσία εναπόθεσης αντισωμάτων, όπως συμβαίνει στην ανοσοπενική αγγειίτιδα και στη C3

σπειραματοπάθεια. Επιπλέον η σοβαρή φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό μηννοειδών σχηματισμών.

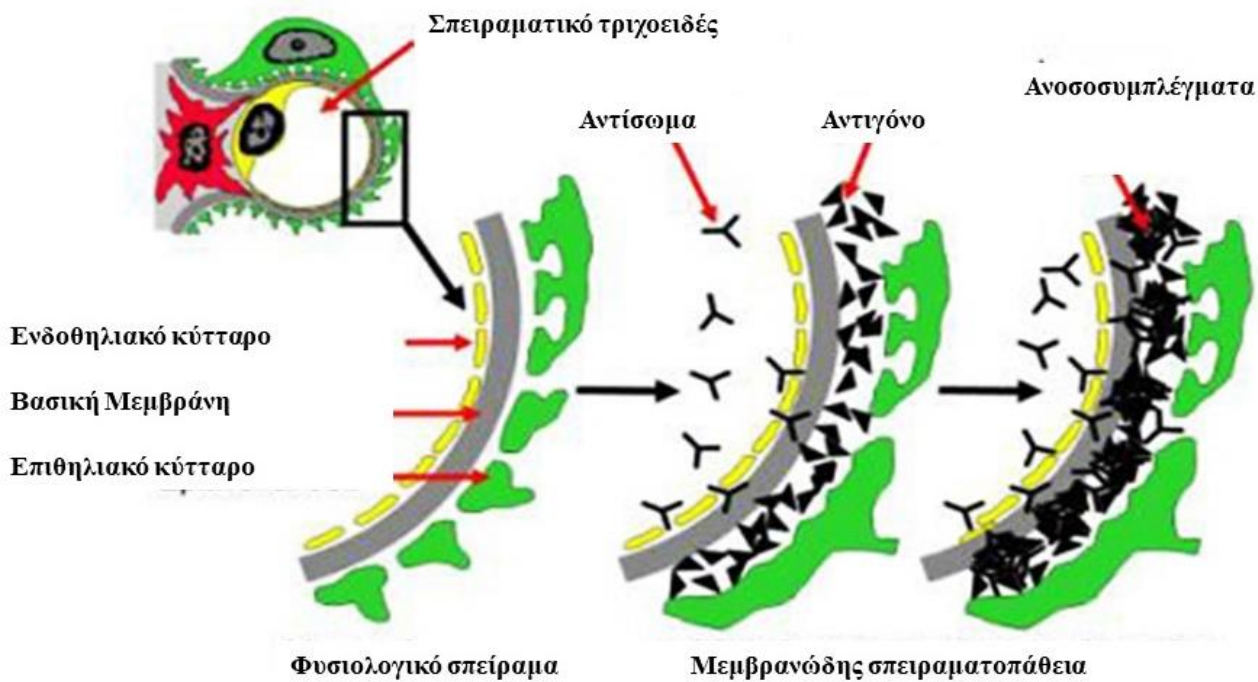


**Εικόνα 11:** Μηννοειδική σπειραματονεφρίτιδα σε οπτικό μικροσκόπιο. Σπείραμα με ημισεληνοειδή κυτταροβριθή σχηματισμό-μηννοειδής σχηματισμός, ο οποίος οδηγεί σε απόφραξη του σπειράματος. [τροποποιημένο από: Heptinstall's Pathology of the Kidney, 7E (2014)]

Αντίθετα οι υποεπιθηλιακές εναποθέσεις, όπως συμβαίνουν συχνά στη MN, δεν αναγεννούν φλεγμονώδη απάντηση, καθώς διαχωρίζονται από τη συστηματική κυκλοφορία από τη ΣΒΜ. Εξαιρεση εδώ αποτελεί η μεταστρεπτοκοκκική ΣΝ, όπου χαρακτηριστικό της αποτελούν οι υποεπιθηλιακοί ύβοι (humps), οι οποίοι αναγνωρίζονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και περιέχουν IgG, C3, και το αντιγόνο του στρεπτόκοκκου.



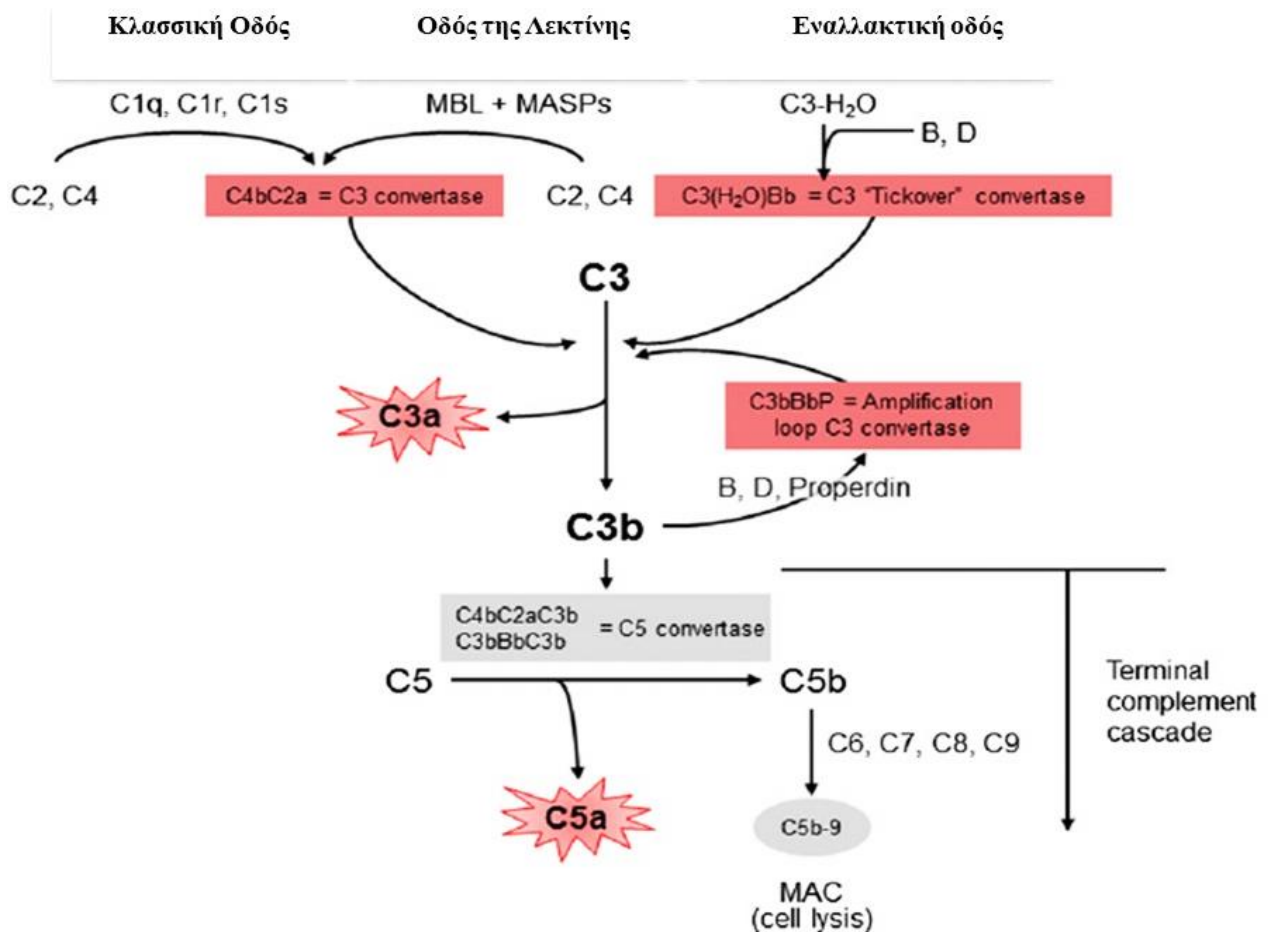
**Εικόνα 12:** C3 σπειραματονεφρίτιδα. Ανοσοεναποθέσεις στο μεσάγγειο και υπενδοθηλιακά και υποεπιθηλιακά. (τροποποιημένο από: <https://nephcure.org/livingwithkidneydisease/ns-and-other-glomerular-diseases/membranous-nephropathy-mn/>)



**Εικόνα 13:** Ανοσοεναποθέσεις στη μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια (τροποποιημένο από: <https://nephcure.org/livingwithkidneydisease/ns-and-other-glomerular-diseases/membranous-nephropathy-mn/>)

## A. Ο ρόλος του συμπληρώματος και των χημικών μεσολαβητών

Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της σπειραματικής βλάβης παίζει η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος και οι χημικοί μεσολαβητές (π.χ. ανασταλτικός παράγοντας των μακροφάγων παράγοντας), χημειοκίνες, κυτοκίνες [68-70].



**Εικόνα 14:** Καταρράκτης του συμπληρώματος (τροποποιημένο από: doi: 10.1681/ASN.2015020184)



### 1) Χημιοτακτικός παράγοντας C5a

Απελευθερώνεται από το C5 συστατικό του συμπληρώματος, και είναι ιδιαίτερα σημαντικός στην πειραματική φλεγμονή, όταν αυτή επάγεται από αντισώματα. Το C5a βοηθάει στην προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων, όπως ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, μονοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα και στην ενεργοποίηση φαγοκυττάρων, απελευθέρωση ενζύμων από τα κύρια κοκκία και ενεργοποίηση οξειδωτικών παραγόντων τα οποία συμβάλλουν στην ιστική βλάβη.

Στην ANCA-σχετιζόμενη αγγειίτιδα, η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων και η πειραματική βλάβη επάγεται από τον υποδοχέα C5a [71]. Έχει φανεί ότι η αναστολή του C5a υποδοχέα προστατεύει έναντι της MPO-αγγειίτιδας σε ποντίκια. Επιπλέον, τυχαίοποιημένη μελέτη με αναστολή του C5a σε ασθενείς με AAV έχει καταγράψει καλά αποτελέσματα στην αποτελεσματικότητα και στη μείωση των κορτικοστεροειδών στη θεραπεία [72].

### 2) C3 και C4 συστατικά του συμπληρώματος

Η ανοσοσυμπλεγματικής αιτιολογία ΣΝ βελτιώνεται σε διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν μαζικά έναν αναστολέα του συμπληρώματος στο πλάσμα και σε ποντίκια στα οποία τα γονίδια για τους παράγοντες του συμπληρώματος C3 και C4 έχουν απαλειφθεί [73].

### 3) C5b-9 χημιοτακτικός παράγοντας

Αν και μελέτες για το ρόλο του C5b-9 εστιάζουν κυρίως στις ποδοκυττοπάθειες, το C5b-9 είναι υπεύθυνο για την ανοσολογική βλάβη στα μεσαγγειακά κύτταρα (όπως στη IgA, νεφρίτιδα του λύκου) και στα ενδοθηλιακά κύτταρα (νεφρίτιδα του λύκου και C3 σπειραματοπάθεια) [74].

### 4) Εναλλακτική οδός του συμπληρώματος

Η C3 σπειραματοπάθεια περιλαμβάνει μια ομάδα πειραματικών νοσημάτων ως αποτέλεσμα διαταραχών της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος. Παρατηρείται ανώμαλος έλεγχος της ενεργοποίησης, της εναπόθεσης ή της αποδόμησης του

συμπληρώματος. Προκύπτουν μεταλλάξεις ή αυτοαντισώματα έναντι ρυθμιστικών πρωτεϊνών του καταρράκτη του συμπληρώματος (CFI, CFH), ή αυτοαντισώματα έναντι της C3 κονβερτάσης (C3 νεφριτιδικός παράγοντας) [75]. Κύριος υποκείμενος παθογενετικός μηχανισμός αποτελεί η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού. Αναστολή της εναλλακτικής οδού αποτελεί θεραπευτικό στόχο για ασθενείς με C3 σπειραματοπάθεια ή άτυπο αιμολυτικό αιμολυτικό σύνδρομο [76].

5) **MIF προφλεγμονώδης κυτοκίνη**

Η χορήγηση αντισώματος κατά του ανασταλτικού παράγοντα των μακροφάγων (MIF) φάνηκε να μειώνει την σπειραματική βλάβη και την προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων [77].

6) **Χημειοκίνες MCP-1, RANTES και υποδοχείς χημειοκινών CCR2, CCR5**

Ανεπάρκεια ή αναστολή αυτών των χημειοκινών ή των υποδοχέων έχει φανεί σε μοντέλα ζώων να αποτρέπει ΣΝ [78].

7) **CXCR1 χημειοκίνη**

Η έκφραση της σχετίζεται με στρατολόγηση ουδετεροφίλων στο σπείραμα στις ανθρώπινες ΣΝ [79].

## **B. Ο ρόλος των φλεγμονωδών κυττάρων**

1) **Ουδετερόφιλα**

Τα ουδετερόφιλα είναι παρόντα σε διάφορες ΣΝ, μεταστρεπτοκοκκική ΣΝ, IgA αγγειίτιδα, μεμβρανοϋπερπλαστική ΣΝ, ANCA-σχετιζόμενη αγγειίτιδα, νεφρίτιδα του λύκου. Η παρουσία τους στα σπειραματικά τριχοειδή εξαρτάται από την παραγωγή χημειοτακτικών παραγόντων εντός και πέριξ φλεγμονώδους εστίας με κύριο το C5a (από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος) και διάφορες χημειοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-8, που μπορούν να συνδέονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω πρωτεογλυκανών θεϊκής επαράνης [80,81]. Τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα στα φυσιολογικά τριχοειδή παραμένουν για μερικά λεπτά [82], ενώ σε συνθήκες σπειραματικής φλεγμονής

επιμηκύνεται η διάρκεια παραμονής τους. Κατά τη διάρκεια «κράτησης» τους στο σπείραμα τα ουδετερόφιλα είτε παραμένουν στατικά είτε «κυλούν» στα πειραματικά τριχοειδή. Σε απάντηση στα ανοσοσυμπλέγματα παράγουν οξειδωτικούς παράγοντες.

Η εγγενής ανοσία (ανοσολογικές απαντήσεις παρούσες από τη γέννηση και όχι εκμαθημένες μετά την έκθεση σε μικροοργανισμούς) παίζει σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων στο σπείραμα. Από πειραματικά μοντέλα προκύπτουν: 1. Toll-like receptor 9 (TLR9) επάγει τη συγκέντρωση ουδετεροφίλων στην anti-GBM νόσο [83]. 2. Στόχος της εγγενούς ανοσίας φαίνεται να είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπου παρατηρείται αυξημένη έκφραση του TLR9 μετά από διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη (LPS) [84]. 3. Σε πειραματικό ζωικό μοντέλο κοκκιωμάτωσης με πολυαγγειίτιδα παρατηρήθηκε συνεργική δράση LPS στη στρατολόγηση ουδετεροφίλων στο νεφρό και πνεύμονα και στη λειτουργική βλάβη, που προϋποθέτει την παρουσία TLR9. Τα ουδετερόφιλα αλληλεπιδρούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω μορίων προσκόλλησης (σελεκτίνες, ιντεγκρίνες CD11/CD18 και Ig like μορίων) [80,85]. Τα ουδετερόφιλα φαγοκυτταρώνουν τα ανοσοσυμπλέγματα, ενεργοποιούνται και παράγουν ενεργείς ρίζες οξυγόνου (ROS), με κύριο το υδροξείδιο του υδρογόνου. Επίσης απελευθερώνουν πρωτεάσες σερίνης, όπως ελαστάση και καθεψίνη-G από τα κοκκία τους, τα οποία αποδομούν συστατικά του ενδοθηλίου των τριχοειδών.

Τα ουδετερόφιλα παίζουν ρόλο στην παθογένεια της νεφρίτιδας σε ANCA-αγγειίτιδα. Παρότι ανοσοπενική, πρόκειται για αυτοάνοση κατάσταση οφειλόμενη στην παρουσία των ANCA (antineutrophil cytoplasmic autoantibodies). Τα ANCA αντιγόνα (MPO, PR3) εκτίθενται από το κυτταρόπλασμα στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων υπό τη δράση κυτοκινών. Τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται είτε μέσω άμεσης σύνδεσης ANCA-αντιγόνων και αντισωμάτων στην επιφάνεια του ουδετεροφίλου είτε μέσω του Fc υποδοχέα ο οποίος δεσμεύει ANCA ανοσοσυμπλέγματα που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον των ουδετεροφίλων και στα αγγειακά τοιχώματα. Στην συνέχεια τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα προσκολλώνται στο τοίχωμα των μικρών- κυρίως- αγγείων σε στενή σχέση με το ενδοθήλιο. Τέλος, απελευθερώνουν τοξικούς μεταβολίτες οξυγόνου

και λυτικά ένζυμα που προκαλούν νεκρωτική βλάβη στο αγγειακό τοίχωμα και στο πέριξ ιστό [86].

## 2) Μακροφάγα

Σημαντικός ο ρόλος τους στην πειραματική βλάβη και ιδιαίτερα στο σχηματισμό μηνοειδών σχηματισμών [87]. Τα μακροφάγα εγκαθίστανται στο σπείραμα, μέσω αλληλεπιδράσεων από ανοσοσφαιρίνες (μέσω Fc υποδοχέα) και χημειοκινών, όπως τη χημειοτακτική πρωτεΐνη των μακροφάγων (MCP1), φλεγμονώδης πρωτεΐνη 1-α των πρωτεϊνών (MIP-1-alpha), RANTES, MMP-9 [88].

Σε αντίθεση με τα ουδετερόφιλα τα μακροφάγα επιστρατεύονται από μόρια προερχόμενα από τα λεμφοκύτταρα (π.χ. MIF) ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε ευαισθητοποιημένα T κύτταρα και ενδοπειραματικά αντιγόνα [89]. Εγκαθίστανται στο σπείραμα μέσω αλληλεπιδράσεων με μόρια προσκόλλησης των λευκοκυττάρων. Η σημασία τους στην επαγωγή πειραματικής βλάβης φαίνεται από την ευεργετική επίδραση της απόλεια τους, αναστολής του MIF, αναστολής του GM-CSF. Στη μηνοειδική ΣΝ εμπλέκονται στη μετάβαση από την οξεία φλεγμονή στη χρόνια ίνωση [90].

Τα μακροφάγα αποτελούν εκτελεστικά όργανα τόσο στη χυμική όσο και στη κυτταρική ανοσολογικώς επαγόμενη πειραματική βλάβη. Αποτελούν το κύριο τύπο κυττάρων τα οποία προσελκύονται από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα, χωρίς την παρουσία αντισωμάτων [91]. Όπως και τα ουδετερόφιλα, εκκρίνουν πρωτεάσες και οξειδωτικές ρίζες, ενώ σε αντίθεση με τα ουδετερόφιλα τα μακροφάγα εκκρίνουν ιστικούς παράγοντες, που προκαλούν εναπόθεση ινικής και σχηματισμό μηνοειδών σχηματισμών και του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (TGF) βήτα, που επάγει την ίνωση.

## 3) T κύτταρα

Τα T-κύτταρα σπάνια αποτελούν εξέχοντα κύτταρα σε πειραματική βλάβη, αλλά μπορεί να βρεθούν σε ΣΝ όπου κυριαρχούν τα μακροφάγα, όπως η μηνοειδική ΣΝ. Απουσία αντισώματος, τα T κύτταρα που ανευρίσκονται στο σπείραμα δε θεωρούνται νεφριτογόνα με εξαίρεση τους παράγοντες διαπερατότητας που εκκρίνονται από αυτά [92]. Η

σπειραματική βλάβη από τα T κύτταρα προκύπτει κυρίως από απελευθέρωση χημειοκινών και την προσέλκυση μακροφάγων [93].

#### 4) Αιμοπετάλια

Ανευρίσκονται σε αρκετές μορφές ΣΝ, κυρίως όταν συμπεριλαμβάνεται ενδοσπειραματική θρόμβωση, όπως στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και σε θρομβωτικές μικροαγγειοπάθειες. Εκτός από την θρόμβωση, ενοχοποιούνται για ενδοθηλιακή βλάβη και απελευθέρωση ουσιών, όπως αγγειοδιασταλτικών ουσιών, μιτογόνων και χημειοτακτικών παραγόντων [94].

### Γ. Ενεργοποίηση ή/και πολλαπλασιασμό των υπαρχόντων σπειραματικών κυττάρων

#### 1) Ενεργοποίηση μεσαγγειακών κυττάρων

Πιο συχνά ανευρίσκεται σε IgA νεφροπάθεια, IgA αγγειίτιδα, νεφρίτιδα του λύκου κ.α. Διάφορες μελέτες in vitro έχουν ταυτοποιήσει αρκετούς παράγοντες, που ενεργοποιούν τα μεσαγγειακά κύτταρα [95-97].

- Κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη 1, παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF)
- Αυξητικοί παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-βήτα (TGF), αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF), ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (VEGF)
- C5b-9 και το σύμπλεγμα που προσβάλλει τη μεμβράνη
- Ανοσοσυμπλέγματα
- Ενεργείς ρίζες οξυγόνου

Η μεσαγγειακή απάντηση χαρακτηρίζεται από μεταβολές στις πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, που ευνοούν την υπερπλασία, αλλαγή φαινότυπου (μυοϊνοβλαστικός-ακτίνη θετικός- φαινότυπος), παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας και/ή απόπτωση. Πολλές από αυτές τις αλλαγές σχετίζονται με συγκεκριμένους υποδοχείς των μεσαγγειακών κυττάρων, όπως IgA υποδοχέων, υποδοχέων τρανσφερρίνης, toll-like υποδοχέων. Ενεργοποιημένα μεσαγγειακά κύτταρα παράγουν χημειοκίνες και κυτοκίνες, οι οποίες δρουν στα ίδια τα μεσαγγειακά κύτταρα ή σε παρακείμενα κύτταρα ή σε λευκοκύτταρα.

Στην IgA νεφροπάθεια η παθολογικά γλυκοζυλιωμένη IgA1 συνδέεται στα μεσαγγειακά κύτταρα μέσω των υποδοχέων της τρανσφερρίνης. Η τρανσγλουταμινάση 2 εμπλέκεται σε διαδικασία ενίσχυσης της σύνδεσης της IgA. Απουσία τρανγλουταμινάσης 2 προκαλεί σημαντική μείωση των μεσαγγειακών εναποθέσεων IgA [98]. Επίσης στην IgA νεφροπάθεια στην πειραματική βλάβη, σημαντικό ρόλο παίζει και το συμπλήρωμα με την οδό της λεκτίνης.

## **2) Βλάβη ενδοθηλιακών κυττάρων**

Η βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων αποτελεί αρχικό στόχο σε κάποιες παθήσεις, όπως τις θρομβωτικές μικροαγγειοπάθειες, προεκλαμψία, κάποιες αγγειίτιδες. Η βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων επάγει υπερπλασία, φαινοτυπική αλλαγή (έκφραση μορίων προσκόλλησης), απελευθέρωση αγγειοδραστικών ουσιών (ενδοθελίνη, νιτρικό οξύ) και μετατροπή σε προθρομβωτικό στάδιο. Αυτές οι αλλαγές προκαλούν υπερπλασία, απόπτωση, αποκόλληση, προσκόλληση λευκοκυττάρων και θρόμβωση [99,100].

## **3) Βλάβη των τοιχωματικών επιθηλιακών κυττάρων (PECs)**

Ο κύριος ρόλος των τοιχωματικών κυττάρων αποτελεί στο σχηματισμό των μηνοειδών σχηματισμών, αν και η πρωταρχική βλάβη συμβαίνει στα σπλαχνικά κύτταρα ή στη ΣΒΜ. Υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων τύπων πειραματικών κυττάρων. Ένα παράδειγμα αποτελεί την αλληλεπίδραση των τοιχωματικών με τα σπλαχνικά επιθηλιακά κύτταρα στο σχηματισμό των μηνοειδών σχηματισμών. Η ινική και τα συστατικά του πλάσματος συμβάλλουν στην υπερπλασία των τοιχωματικών κυττάρων. Επιπλέον τα τοιχωματικά κύτταρα μπορούν είτε να αντικαταστήσουν τα προσβεβλημένα ποδοκύτταρα ή να συμβάλλουν στην ουλοποίηση και στην απώλεια των ποδοκυττάρων. Τα τοιχωματικά κύτταρα παίζουν κριτικής σημασίας ρόλο στην ανάπτυξη πειραματικής σκλήρυνσης. Μετά την πειραματική βλάβη ενεργοποιούνται και αλλάζουν τον φαινότυπο τους (ικανότητα μετανάστευσης, υπερπλασίας και/ή εναπόθεσης ουσίας) [101-103]. Τα ενεργοποιημένα τοιχωματικά κύτταρα αλλάζουν μορφολογικά και λαμβάνουν μεγαλύτερο κυβοειδές κυτταρόπλασμα, με διογκωμένους πυρήνες και πεπαχυσμένες μεμβράνες, ενώ ανοσοϊστοχημικά εκφράζουν de novo τον δείκτη CD44,

όπως έχει παρατηρηθεί σε πειραματικά μοντέλα στη ΕΤΣΣ. Σε πειραματικά μοντέλα επίσης έχει βρεθεί ότι κατά την ανάπτυξη σπειραματοσκλήρυνσης «διηθούν» το σπειραματικό θύσανο στη θέση μιας σύμφυσης και από εκεί καλύπτουν περιοχές της σπειραματικής επιφάνειας και στη φάση αυτή παρατηρείται εναπόθεση ουσίας.

### **5.3.3 Μη φλεγμονώδης Σπειραματική Βλάβη**

Η μη φλεγμονώδης σπειραματική βλάβη στοχεύει το σπλαχνικό τοιχωματικό κύτταρο (ποδοκύτταρο) και αυξάνει την σπειραματική διαπερατότητα. Κύριες αιτίες αποτελούν η νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων (ΝΕΑ), η εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (ΕΤΣΣ) και η μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια (ΜΝ) και αποτελούν τις ποδοκυττοπάθειες.

## **5.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΡΧΗΣ ΣΕ ΠΟΔΟΚΥΤΤΟΠΑΘΕΙΕΣ**

Περιλαμβάνει ανοσολογικούς παράγοντες, όπως παράγοντες προερχόμενους από τα Τ κύτταρα, αγγειοδραστικούς παράγοντες, το σύμπλεγμα που προσβάλλει τη μεμβράνη (C5b-9) και κυτοκίνες, όπως ιντερλευκίνη-13 που μπορούν να επάγουν δυσλειτουργία των ποδοκυττάρων, χωρίς να επάγουν φλεγμονή. Αυτοί οι παράγοντες δεν εμπλέκονται στη δευτεροπαθή ΕΤΣΣ που οφείλεται σε προσαρμοστικούς μηχανισμούς στην υπερδιήθηση ή σε ουλοποίηση προηγούμενων ενεργών βλαβών (νεφρίτιδα του λύκου, αγγειίτιδα). Επίσης η γονιδιακή νόσος αποτελεί μια αιτία ΕΤΣΣ συνήθως στην παιδική ηλικία και παρουσιάζεται ανθεκτική στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή [104-106].

### **Α. Παράγοντες που αυξάνουν τη διαπερατότητα**

Η υπόθεση ότι στη ΝΕΑ και στη ΕΤΣΣ υπάρχει κυκλοφορών παράγοντας που αυξάνει τη διαπερατότητα στηρίζεται στα ακόλουθα:

- 1) Ταχεία υποτροπή μετά τη μεταμόσχευση σε ασθενείς με ΝΕΑ, ΕΤΣΣ [107].
- 2) Η ικανότητα του ορού ασθενών με ΝΕΑ ή ΕΤΣΣ να αυξάνουν τη διαπερατότητα στην αλβουμίνη σε φυσιολογικά σπειράματα in vitro [108].
- 3) Γρήγορη υποστροφή της νόσου όταν νεφροί με ΝΕΑ τοποθετούνται σε φυσιολογικό περιβάλλον [109].
- 4) Μεταβίβαση από τη μητέρα στο έμβryo, παράγοντα που αυξάνει τη διαπερατότητα, όπως ο διαλυτός υποδοχέας πλασμινογόνου ουροκινάσης (suPAR) [110].

### **Μηχανισμοί αυξημένης σπειραματικής διαπερατότητας**

Οι πιθανοί μηχανισμοί που ο κυκλοφορών παράγοντας προσβάλλει τα ποδοκύτταρα και αυξάνει τη διαπερατότητα είναι οι ακόλουθοι:

- 1) Αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών του σχισμοειδούς διαφράγματος, που αλλάζουν τη δομή και τη λειτουργία του και αυξάνουν τη διαπερατότητα [111-113].
- 2) Παρεμβολή στη ποδοκυτταρική πρόσφυση στη ΣΒΜ [114].

Οι κυκλοφορούντες παράγοντες suPAR (soluble urokinase receptor) [115] και Angptl4 [116] (που εκκρίνεται από τα ποδοκύτταρα) αποτελούν πιθανούς παράγοντες διαπερατότητας.

### **Ο πιθανός ρόλος του suPAR (soluble urokinase plasminogen activating receptor)**

Το uPAR αποτελεί μεμβρανική πρωτεΐνη που συνδέεται με τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης, τη βιτρονεκτίνη και ιντεγκρίνες. Η διάσπαση του uPAR και η γλυκοζυλίωση των τμημάτων του παράγει ποικίλα κυκλοφορούντα μόρια. Ορισμένες μορφές του suPAR επάγουν ΕΤΣΣ σε ποντίκια. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντος suPAR στον ορό συνδέονται με πρωτοπαθή ΕΤΣΣ. Επιπλέον σε ποντίκια με έλλειψη uPAR η χορήγηση ή υπερέκφραση suPAR ενεργοποιεί την ανβ3 ιντεγκρίνη στα



ποδοκύτταρα με επακόλουθη σύντηξη αυτών και πρωτεϊνουρία. Οι δράσεις αυτές αποφεύχθηκαν με χορήγηση uPAR-specific αντισώματος. [117]

Ο αμφιλεγόμενος ρόλος του suPAR στηρίζεται:

- 1) Ασθενείς με πρωτοπαθή ΕΤΣΣ λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο της ποδοσίνης (NPHS2), έχουν αυξημένα επίπεδα suPAR σε σχέση με αυτούς που δεν έχουν τη μετάλλαξη και η υποτροπή σε αυτούς τους ασθενείς συμβαίνει λιγότερα συχνά, σε σχέση με αυτούς με μη γενετική πρωτοπαθή ΕΤΣΣ [118].
- 2) Τα επίπεδα suPAR στον ορό δε διαχωρίζουν τη πρωτοπαθή από τη δευτεροπαθή ΕΤΣΣ [119].
- 3) Η χορήγηση suPAR δεν ήταν αρκετή από μόνης της να επάγει πρωτεϊνουρία σε ποντίκια [120].
- 4) Τα επίπεδα suPAR δεν ξεχωρίζουν τη ΕΤΣΣ από άλλες σπειραματοπάθειες.
- 5) Αποτελεί μη ειδικό δείκτη νεφρικής νόσου

Επομένως παραμένουν ερωτήματα, όσον αφορά την συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων suPAR με ειδικές κατηγορίες ΕΤΣΣ και την προγνωστική αξία τους σε αυτούς τους ασθενείς.

### **Ο πιθανός ρόλος του B7-1/ CD80**

Υπερεκφράζεται σε ασθενείς με ΝΕΑ και ΕΤΣΣ ενώ δεν εκφράζεται σε φυσιολογικά ποδοκύτταρα. Προτάθηκε ότι η έκφραση του στα ποδοκύτταρα θα μπορούσε να διαφοροδιαγνώσει τη δευτεροπαθή ΕΤΣΣ και προβλέψει την ανταπόκριση στη θεραπεία. Έχουν ανευρεθεί στα ούρα ασθενών με ΝΕΑ (ειδικά υπό υποτροπής) υψηλά επίπεδα CD80 και όχι σε ΕΤΣΣ. Υπάρχουν όμως αντικρουόμενα αποτελέσματα καθώς άλλοι ερευνητές δεν ανέδειξαν παρουσία του στα ποδοκύτταρα ασθενών με ΕΤΣΣ, ενώ πρόσφατα βρέθηκε και σε διαβητική νεφροπάθεια [121].

## **Ο πιθανός ρόλος Angptl4 (angiotensin-like 4 protein)**

Αρχικά εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα από φυσιολογικά ποδοκύτταρα. Η υπερέκφραση της Angptl4 όμως από τα ποδοκύτταρα προκαλεί σύνδεση της πρωτεΐνης με την ΣΒΜ, νεφρωσικού εύρους πρωτεϊνουρία (>500 φορές αύξηση της αλβουμίνης) και διάχυτη εξάλειψη των ποδοκυτταρικών προσεκβολών, όπως συμβαίνει στη ΝΕΑ. Αντίθετα διαγονιδιακή έκφραση της Angptl4 από το λιπώδη ιστό αυξάνει τα επίπεδα της κυκλοφορούσας Angptl4 αλλά δεν προκαλεί πρωτεϊνουρία. Η ελαττωματική σιαλυλίωση μορίων σιαλικού οξέος (defective sialylation) της Angptl4 φαίνεται να εμπλέκεται στην αύξηση της πειραματικής διαπερατότητας. Σε ένα πειραματικό ζωϊκό μοντέλο αρουραίου η χορήγηση προδρόμου σιαλικού οξέος φάνηκε να αυξάνει τα επίπεδα Angptl4 και να μειώνει την πρωτεϊνουρία κατά 40 φορές. Επιπλέον η πειραματική έκφραση της Angptl4 είναι κορτικοευσίσθητη. Αυτό αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα των κορτικοστεροειδών στη θεραπεία της ΝΕΑ [116].

## **Β. Σύμπλεγμα που προσβάλλει τη μεμβράνη στη μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια**

Στη ΜΝ η δημιουργία υποεπιθηλιακών ανοσοεναποθέσεων από IgG (κυρίως IgG4 τάξης), C3 και C5b-9 (σύμπλεγμα που προσβάλλει τη μεμβράνη) μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της πειραματικής διαπερατότητας και μεγάλης πρωτεϊνουρίας, χωρίς να δημιουργηθεί φλεγμονώδη αντίδραση [122-125]. Στο πειραματικό μοντέλο της νεφρίτιδας Heymann, οι υποεπιθηλιακές εναποθέσεις δημιουργούνται ως αποτέλεσμα της σύνδεσης *in situ* IgG αντισώματος με τη μεγαλίνη, μια πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται στα επικαλυμμένα με κλαθρίνη βοθρία των ποδοκυτταρικών προσεκβολών [126]. Όμως, η μεγαλίνη δεν εκφράζεται σε ανθρώπους. Επίσης μελετήθηκε η ανάπτυξη ΜΝ σε παιδιά που οι μητέρες τους είχαν γενετικό έλλειμμα της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP), ενός αντιγόνου που εκφράζεται στη μεμβράνη των ποδοκυττάρων [126]. Οι μητέρες ανέπτυξαν αντισώματα έναντι της NEP, τα οποία αντέδρασαν με την NEP στα εμβρυϊκά σπειράματα και οδήγησαν στην ανάπτυξη τυπικής ΜΝ. Οι μελέτες αυτές απέδειξαν ότι ενδογενή ποδοκυτταρικά αντιγόνα ευθύνονται για τον *in situ* σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων.

Το κυριότερο αντιγόνο στη MN αποτελεί ο υποδοχέας της φωσφολιπάσης A2 (PLA2R) με τα κυκλοφορούντα αντισώματα (κατεξοχήν τάξης IgG4) να ανευρίσκονται στο 80% των ασθενών με ιδιοπαθή MN [127]. Επιπρόσθετα η σοβαρότητα της νόσου έρχεται σε συνάρτηση με τα επίπεδα των anti-PLA2R στον ορό.

Η THSD7A (Thrombospondin type-1 domain-containing 7A) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη των ποδοκυττάρων και αποτελεί το υπεύθυνο αντιγόνο σε 3% των ασθενών με MN και σε 10% των ασθενών με ιδιοπαθή MN που είναι αρνητικοί σε anti- PLA2R. Η συσχέτιση εξετάστηκε σε 154 ασθενείς με ιδιοπαθή MN και (-) anti-PLA2R, σε 74 ασθενείς με ιδιοπαθή MN και (+) anti-PLA2R, σε 76 ασθενείς με άλλες σπειραματικές νόσους και σε 44 υγιείς μάρτυρες. Ανευρέθηκαν αντισώματα έναντι THSD7A σε 15/154 ασθενείς με (-) anti-PLA2R. Επίσης έχει βρεθεί ότι η THSD7A παίζει κάποιο ρόλο στη παθογένεια παρανεοπλασματικής MN [128-129].

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε το αντιγόνο NELL-1 (Neural epidermal growth factor-like 1) ως υπεύθυνο στη MN σε 16% με (-) anti-PLA2R. Η συσχέτιση εξετάστηκε σε 35 ασθενείς με (-) anti-PLA2R, σε 23 ασθενείς με (+) anti-PLA2R MN, και 88 με άλλες σπειραματικές νόσους. Ανευρέθηκαν αντισώματα σε 6 ασθενείς με (-) anti-PLA2R και σε κανέναν ασθενή από τις υπόλοιπες ομάδες [130].

## **1. Μηχανισμοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος**

Στη MN είναι πιθανό η ενεργοποίηση του συμπληρώματος να ακολουθεί την οδό της λεκτίνης. Βέβαια η οδός της λεκτίνης που συνδέεται με τη μανόζη (MBL) και η εναλλακτική οδός είναι ενεργοποιημένες στη MN. Στην υποκατηγορία ασθενών με ανεπάρκεια της οδού της λεκτίνης (10% του γενικού πληθυσμού), μόνο η εναλλακτική οδός είναι ενεργοποιημένη, το οποίο ταιριάζει με την απουσία C4d εναποθέσεων σε αυτούς τους ασθενείς [131].

## 2. Μηχανισμοί ανοσολογικής βλάβης

Το C5b-9 φαίνεται να είναι ο κύριος παράγοντας που διαταράσσει την πειραματική διαπερατότητα στη MN καθώς η έλλειψη του ή η γονιδιακή απώλεια μειώνει την ικανότητα αντισωμάτων να προκαλούν πρωτεϊνουρία σε μοντέλα ζώων. Παρόμοιος μηχανισμός φαίνεται να ισχύει και στους ανθρώπους, στηριζόμενο στο ότι υπάρχει αυξημένο C5b-9 στα ούρα ασθενών με ενεργό MN και στην παρουσία C3 και C5b-9 στις υποεπιθηλιακές ανοσοεναποθέσεις. [132-134]

Οι μηχανισμοί του C5b-9 στα ποδοκύτταρα που οδηγεί στην πρωτεϊνουρία οφείλεται κατά κύριο ρόλο στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επιπλέον έχει τις εξής δράσεις:

- 1) Αυξάνει την έκφραση του TGF-2, TGF-3 των υποδοχέων τους, οδηγώντας σε αύξηση της εξωκυττάριας ουσίας, οδηγώντας στην πάχυνση της ΣΒΜ [135].
- 2) Οδηγεί σε απόπτωση των ποδοκυττάρων και έκκριση τους στα ούρα [135].
- 3) Διαταράσσει τη μορφολογία της διαφραγματικής σχισμής, διαχωρίζοντας τη νεφρίνη από τον κυτταροσκελετό της ακτίνης [136].

## 6. ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ TGF-β-SMAD

Το μονοπάτι του αυξητικού μετατρεπτικού παράγοντα β (Transforming Growth factor β, TGF-β) ελέγχει πλήθος διαδικασιών όπως κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αναγνώριση, διαφοροποίηση, απόπτωση και εξειδίκευση της κυτταρικής ανάπτυξης σε είδη τα οποία κυμαίνονται από έντομα μέχρι και θηλαστικά [137]. Το μονοπάτι του TGF-β βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο και η διαταραχή του μονοπατιού έχει συνδεθεί με ασθένειες, όπως ίνωση και καρκίνος [138, 139].

Ο TGF-β1 θεωρείται μια ισχυρή κυτοκίνη με πολλαπλές λειτουργίες. Συμμετέχει στην παθογένεια της ίνωσης και της φλεγμονής, δύο παθολογικά χαρακτηριστικά, που σχετίζονται με την σπειραματονεφρίτιδα (ΣΝ) [140]. Ο TGF-β1 δρα μέσω ενός κανονικού (canonical) σηματοδοτικού μονοπατιού, στο οποίο συμμετέχουν μεταγραφικοί παράγοντες οι Smad πρωτεΐνες. Αρχικά γίνεται η φωσφορυλίωση και η ενεργοποίηση των Smad2 και Smad3 (pSmad2, pSmad3), και το σύμπλοκο τους μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου και γίνεται μεταγραφή των γονιδιακών στόχων. Η Smad7 συμμετέχει ως αρνητικός ανατροφοδοτικός παράγοντας του μονοπατιού, μέσω πολλαπλών μηχανισμών, αλλά και μέσω αλληλεπίδρασης διασταυρούμενων μονοπατιών (NF-kB μονοπάτι) [141].

Η έκφραση του TGF-β1 είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε πολλές νεφρικές παθήσεις, που επηρεάζουν τα σωληναριακά και μεσαγγειακά κύτταρα, τα ποδοκύτταρα, τα περισωληναριακά ενδοθηλιακά κύτταρα και τα περικύτταρα [142,143]. Πρόσφατες έρευνες ανέδειξαν νέους μηχανισμούς, με τους οποίους ο TGF-β1 μπορεί να προάγει νεφρική βλάβη, όπως χημειοταξία των μακροφάγων και επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA [144,145]. Η ποικιλία των πλειοτροπικών δράσεων μπορεί να οφείλεται εν μέρει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του TGF-β1 μονοπατιού και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών ή και στις διαφορετικές κυτταρικές απαντήσεις που προάγονται από τον TGF-β1.

Η οικογένεια των TGF-β κυτταροκινών (κυτοκινών) χαρακτηρίζεται από έξι (6) συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, κωδικοποιείται από σαράντα δύο (42) ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης στον άνθρωπο και περιλαμβάνει δύο υποοικογένειες, την TGFβ/Activin/Nodal υποοικογένεια και την BMP (Bone Morphogenetic Pathway)/GDF (Growth and Differentiation Factor)/MIS (Muellerian

Inhibiting Substance) υποοικογένεια. Οι δύο υποοικογένειες έχουν διαχωριστεί βάσει της ομοιότητας της αλληλουχίας τους καθώς και των μονοπατιών τα οποία ενεργοποιούν. Έχουν αναγνωριστεί τριάντα τρία (33) μέλη της TGF- $\beta$  οικογένειας κυτταροκινών, τα οποία είναι διμερή και στις περισσότερες περιπτώσεις σταθεροποιούνται από δισουλφιδικούς δεσμούς. Η διμερής διευθέτηση των κυτταροκινών, οι οποίες λειτουργούν ως προσδέτες (ligands), υποδεικνύει το σχηματισμό συμπλόκου με τους TGF- $\beta$  υποδοχείς τύπου I και II (TGF- $\beta$ RI και TGF- $\beta$ RII, αντίστοιχα) [146]. Ο TGF- $\beta$  υπάρχει σε τρεις ισομορφές TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 που προέρχονται από διαφορετικά χρωμοσώματα (19q13, 1q41 και 14q24 αντίστοιχα) από τις οποίες ο TGF- $\beta$ 1 είναι η πιο άφθονη ισομορφή και μπορεί να παραχθεί από όλους τους τύπους των νεφρικών κυττάρων. Επίσης στον TGF- $\beta$ 1 η κλασική αλληλουχία TATAA στον υποκινητή έχει αντικατασταθεί από πολλές ρυθμιστικές περιοχές και έτσι επιτρέπει στον TGF- $\beta$ 1 να ενεργοποιείται άμεσα από πρωτεΐνες, όπως ROS, πλασμίνη, οξέα [147,148]. Συντίθενται σαν αδρανές προπεπτίδιο το οποίο αλληλεπιδρά με το LAP (latency associated peptide) δημιουργώντας ένα σύμπλοκο, το μικρό λανθάνον σύμπλοκο (small latent complex, SLC). Το SLC δεσμεύεται με τη λανθάνουσα δεσμεύουσα τον TGF- $\beta$ 1 πρωτεΐνη (Latent TGF- $\beta$ -binding protein, LTBP), δημιουργείται το μεγάλο λανθάνον σύμπλοκο (large latent complex, LLC) το οποίο εκκρίνεται από το κύτταρο και δεσμεύεται στην εξωκυττάρια ουσία. Η πλασμίνη, οι MMPs, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, η θρομβοσπονδίνη-1 και η ιντεγκρίνη  $\alpha$ V διασπούν το SLC και το LLC και απελευθερώνεται ο δραστικός TGF- $\beta$  [149].

Οι υποδοχείς των TGF- $\beta$  ονομάζονται T $\beta$ R και οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι ο T $\beta$ RI και ο T $\beta$ RII. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς είναι διμερισμένοι, δηλαδή αποτελούνται από δύο ίδιες υποομάδες. Μετά την εμφάνιση ενός διμερούς μορίου TGF- $\beta$  στον εξωκυττάριο χώρο, ακολουθεί η πρόσδεση του στον υποδοχέα του T $\beta$ RII, ο οποίος φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα T $\beta$ RI [150]. Αυτός με την σειρά του θα ενεργοποιήσει σηματοδοτικά μονοπάτια που εξαρτώνται από τις πρωτεΐνες Smads αλλά και μονοπάτια ανεξάρτητων των Smads, όπως p-38, MAPK, Rac, Rho-GTPases, Cdc42, ILK [151].

Υπάρχουν οκτώ διαφορετικές Smad πρωτεΐνες, οι οποίες διαχωρίζονται σε αυτές που ρυθμίζονται μέσω υποδοχέα (Receptor regulated Smads, R-Smads: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8), σε αυτές που συνεργάζονται με τις ενεργοποιημένες από τους υποδοχείς Smad (common mediator Smad, Co-Smad: Smad4) και σε αυτές που δρουν ανασταλτικά (Inhibitory Smads, I-Smads:

Smad6, Smad7). Οι R-Smads φωσφορυλιώνονται απευθείας από τον τύπου I υποδοχέα, ομοδιμερίζονται και σχηματίζουν ετεροδιμερές με τη Co-Smad. Τα ενεργοποιημένα Smad σύμπλοκα μεταφέρονται στον πυρήνα και σε συνδυασμό με άλλους πυρηνικούς συμπαράγοντες ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Οι I-Smads ρυθμίζουν αρνητικά το μονοπάτι καθώς ανταγωνίζονται με τις R-Smads για την αλληλεπίδραση με τον τύπου I υποδοχέα ή τη Smad4 και σηματοδοτούν τους υποδοχείς προς αποικοδόμηση.

Στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF- $\beta$  συμμετέχουν οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες Smad2 και Smad3, οι οποίες ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς, φωσφορυλιώνονται σε δύο κατάλοιπα σερίνης σε μία συντηρημένη ακολουθία -SSXS- στο καρβοξυτελικό τους άκρο και αυτό αποτελεί το κλειδί στην ενεργοποίησή τους [151]. Στο κυτταρόπλασμα η SMAD3 συνδέεται στην αλληλουχία του DNA CAGAC μέσω του βασικού σήματος NLS της δομής MH1 [152]. Παράλληλα, η ενεργοποίηση Smad διευκολύνεται από την πρωτεϊνική τομέα FYVE SARA στα ενδοσώματα και παρουσιάζει τη Smad2, και σε μικρότερο βαθμό τη Smad3 στους αντίστοιχους υποδοχείς [153]. Οι Smad2 και Smad3 σχηματίζουν ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο με την κοινή Smad4 και στη συνέχεια το σύμπλοκο μετατοπίζεται στον πυρήνα, που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων. Αν και μοιράζονται περισσότερο από 90% ομοιότητα στις αλληλουχίες των αμινοξέων τους, οι ρόλοι τους είναι διαφορετικοί. Η Smad2 δεν είναι ικανή να δεσμεύσει άμεσα το γονιδιωματικό DNA [154].

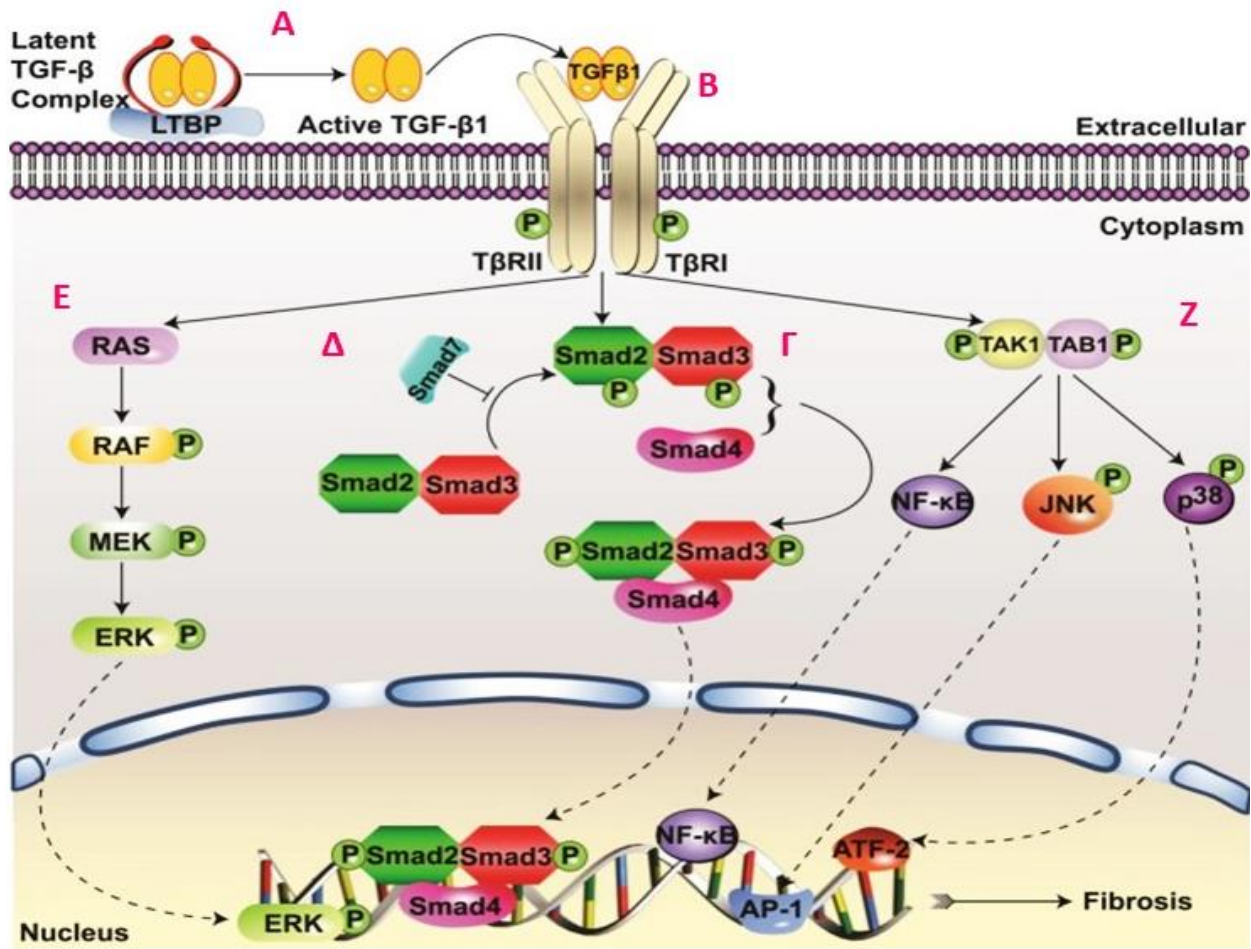
Στην συνέχεια η φωσφορυλίωση των Smad2,3 προκαλεί την απομάκρυνση τους από τον υποδοχέα και τη δημιουργία συμπλόκου με τον Smad4 (co-Smad) [155]. Στην συνέχεια, το σύμπλοκο Smad2/3-Smad4 εισέρχεται στον πυρήνα που ελέγχεται η μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων που ενεργοποιούνται από τον TGF- $\beta$ 1. Για την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης του TGF- $\beta$ 1 απαιτείται η παρουσία ορισμένων συμπαράγοντων ο κυριότερος των οποίων είναι ο P300 [156,157].

Ανασταλτικός παράγοντας στη σηματοδότηση TGF/Smad αποτελεί η Smad7 [158]. Μπορεί να δράσει με 2 τρόπους: εμποδίζει τις αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα με τις R-Smad πρωτεΐνες και την επακόλουθη φωσφορυλίωση των Smad ή αποδομεί τους υποδοχείς T $\beta$ R-I μέσω ουβικουιτίνωσης προσλαμβάνοντας E3 λιγάσες ουβικιτίνης (smurf 1 και smurf 2) που ενώνονται πάνω στον υποδοχέα [159]. Στη ρύθμιση του TGF- $\beta$  μονοπατιού εμπλέκονται διάφορες τάξεις E3

λιγασών όπως οι HECT και οι RING E3 λιγασές. Η HECT E3 λιγάση ουβικιτίνης Smurf1 είναι η πρώτη E3 λιγάση η οποία αναγνωρίστηκε ότι ρυθμίζει το TGF-β μονοπάτι. Η E3 λιγάση Smurf1 ουβικιτινιώνει τις Smad1 και Smad5, ενώ η Smurf2 αλληλεπιδρά με τις Smad1, Smad2, Smad3, Smad4 και ουβικιτινιώνει τη Smad2 υπό σταθερές συνθήκες. Οι Smurf1 και Smurf2 HECT E3 λιγασές εμπλέκονται επίσης στην ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση των δύο υποδοχέων του TGF-β μονοπατιού [160,161]. Μία ακόμα HECT E3 λιγάση η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση του μονοπατιού είναι η NEDD4-2 η οποία σηματοδοτεί την πρωτεασωματική αποικοδόμηση των Smad2 και Smad7 πρωτεϊνών και του TGF-βRI υποδοχέα [161]. Από τις RING E3 λιγασές οι οποίες εμπλέκονται στο TGF-β μονοπάτι η Arkadia είναι η πρώτη η οποία βρέθηκε να ρυθμίζει θετικά το μονοπάτι καθώς επάγει την ουβικιτινίωση και την αποικοδόμηση των Smad7, SnoN και Ski πρωτεϊνών αρνητικών ρυθμιστών του μονοπατιού [160]. Επιπρόσθετα, η RING λιγάση Arkadia εμπλέκεται στον τερματισμό της σηματοδότησης καθώς ουβικιτινιώνει και προκαλεί την αποικοδόμηση του συμπλόκου των φωσφορυλιωμένων Smad2/Smad3 τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενεργοποίηση της Smad-εξαρτώμενης μεταγραφής γονιδίων [162].

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι ο TGF-β1 μπορεί να ρυθμίσει αρκετά miRNAs για να επάγει τη νεφρική ίνωση. Ο TGF-β1 ρυθμίζει προς τα πάνω τα miR-21, miR192, miR-29 και προς τα κάτω τα miR-29, miR-200 [163-165]. Έχει φανεί ότι το miR-21 είναι προς τα πάνω ρυθμισμένο σε μοντέλα ζώων και σε ανθρώπινους ιστούς σε οξεία νεφρική βλάβη και σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Αξίζει να σημειωθεί ότι εκφράζεται και σε υγιή ιστό, κυρίως στο φλοιό, ενώ όταν προκαλείται βλάβη ενεργοποιείται και εκφράζεται κυρίως στο νεφρικό σωληνάριο. Τέλος, τα επίπεδα στο πλάσμα του miR-21 έχουν συσχετιστεί με τη νεφρική ίνωση, σε αντίθεση με τα επίπεδα στα ούρα [166].



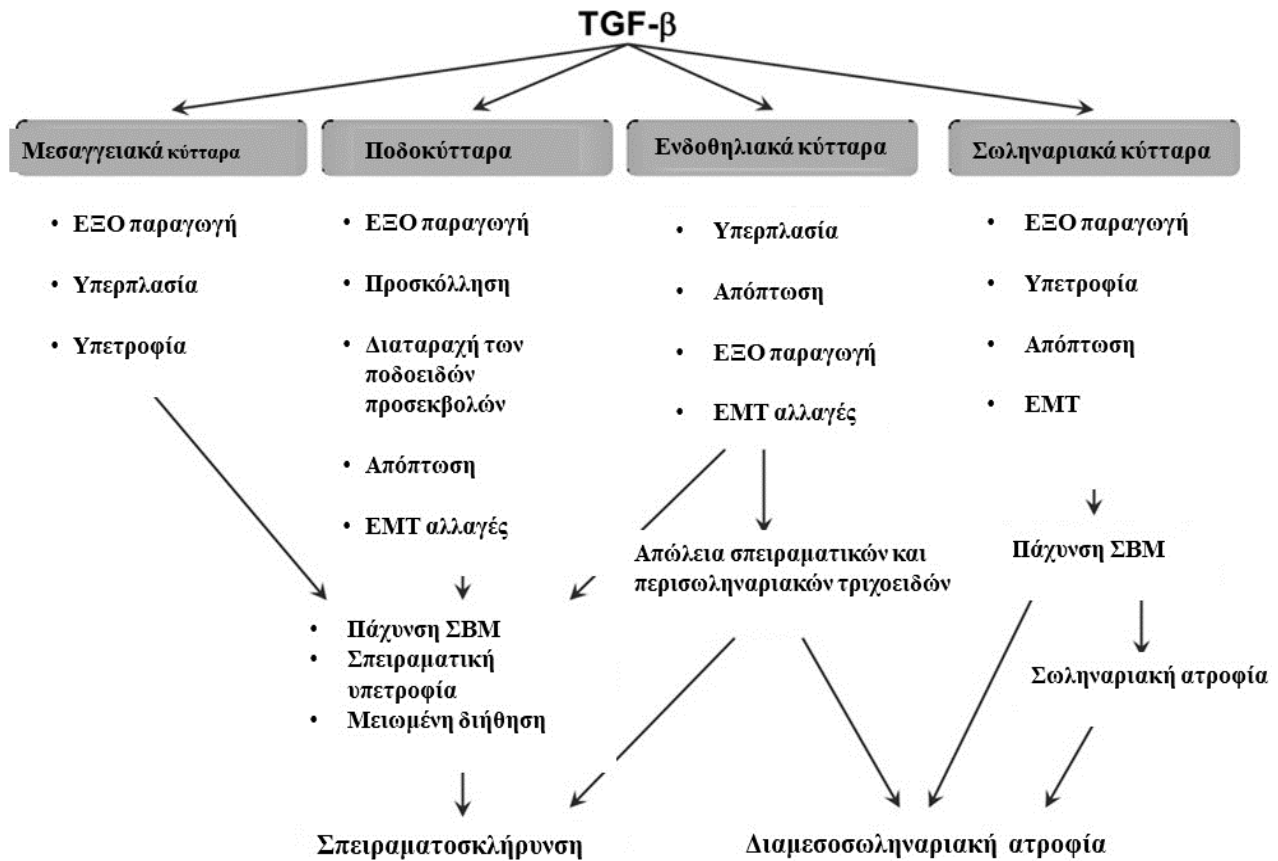


**Εικόνα 15:** Smad και μη-Smad TGF-β1 σηματοδοτικά μονοπάτια. Α. TGF-β1 ενεργοποίηση συμβαίνει με την απελευθέρωση του από το λανθάνον συμπλοκο μέσω πρωτεασών. Β. Το μονοπάτι ξεκινάει με τη σύνδεση του ενεργοποιημένου TGF-β1 στον υποδοχέα τύπου II (TβRII) και σχηματίζοντας το ετερομερές σύμπλοκο TβRI-TβRII. Γ. Οδηγώντας στη φωσφορυλίωση Smad2/3 και τη σύνδεση με τη Smad4 και στη συνέχεια το σύμπλοκο μετατοπίζεται στον πυρήνα και ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδιακών στόχων. Δ. Η Smad7 αποτελεί αρνητικός ρυθμιστής του TGF-β1 μονοπατιού. Ο TGF-β1 επίσης ενεργοποιεί Smad-ανεξάρτητα μονοπάτια όπως το Ε. MAPK, μέσω του Ras-Raf-MEK-ERK μονοπατιού και Ζ. TAK1-TAK1-binding protein 1 (TAB1) μονοπάτι. Η ενεργοποίηση του TAK1 οδηγεί στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (AP-1 και ATF-2) και του NF-κB μονοπατιού. (τροποποιημένο από: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00365.2015>)

## 7. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TGF-β1 ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ

Στο φυσιολογικό ανθρώπινο νεφρό ο TGF-β1 εκφράζεται αμελητέα. Όμως κάτω από παθολογικές καταστάσεις, όπως η διαβητική νεφροπάθεια, η αποφρακτική νεφροπάθεια και οι σπειραματοπάθειες, συντίθεται από αρκετά νεφρικά κύτταρα και συμβάλλει στη διαταραχή της σπειραματικής βασικής μεμβράνης, στην ίνωση, στην σκλήρυνση και στον εκφυλισμό των σωληναρίων με αποτέλεσμα μειωμένη σπειραματική διήθηση και επηρεασμένη νεφρική λειτουργία [167]. Αναλυτικά συμβάλλει στην αύξηση της μεσαγγειακής ουσίας με την εναπόθεση κολλαγόνου τύπου I, III και IV, λαμινίνη και φιμπρονεκτίνη και πρωτεογλυκάνες θειϊκής επαράνης μέσω διαφορετικών σηματοδοτικών οδών (SMAD, p38). Επίσης, προκαλεί μεσαγγειακή υπερτροφία σε παθήσεις, όπως σακχαρώδης διαβήτης. Επιπρόσθετοι παθογενετικοί μηχανισμοί φαίνεται να είναι η απόπτωση και η επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή (epithelial-to-mesenchymal transition-EMT) των κυττάρων. Επίσης σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων σε ποντικούς έχει φανεί ότι ο TGF-β1 οδηγεί στην παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας (φιμπρονεκτίνη, κολλαγόνου τύπου IV α3 αλυσίδα) από τα ποδοκύτταρα, οδηγώντας σε πάχυνση της ΣΒΜ. Τα ποδοκύτταρα όχι μόνο παράγουν συστατικά της ΣΒΜ, αλλά εκκρίνουν και μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP-9), που συμβάλλουν στην πάχυνση της ΣΒΜ. Σε ποντίκια με νεφρωσικό σύνδρομο έχει φανεί ότι ο TGF-β1 καταστέλλει την έκφραση της α3β1-ιντεγκρίνης, η οποία χρησιμεύει στον κυτταροσκελετό των ποδοκυττάρων και στην προσκόλληση τους στη ΣΒΜ, με αποτέλεσμα απόπτωση των ποδοκυττάρων. Ο TGF-β1 ρυθμίζει επίσης τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως υπερπλασία αλλά και απόπτωση. Όσον αφορά τα σωληναριακά κύτταρα προκαλεί απόπτωση και ατροφία και έχει φανεί να έχει επιβλαβή δράση στην απάντηση του σωληναριακού κυττάρου σε νεφροτοξικούς παράγοντες. Επίσης η συμβολή του TGF-β στη σοβαρότητα της οξείας νεφρικής βλάβης υποστηρίζεται από πειράματα σε ποντικούς όπου έχει γίνει επιλεκτική απαλοιφή του TGFβRII. [168]

Πολλοί παράγοντες, όπως το υψηλό επίπεδο γλυκόζης, το οξειδωτικό stress και οι κυτοκίνες μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή του γονιδίου του TGF-β1. Επιπλέον, ενεργοποιημένα T και B κύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, δενδριτικά κύτταρα και άωρα αιμοποιητικά κύτταρα παράγουν TGF-β1 και/ή είναι ευαίσθητα στις δράσεις του [167].



**Εικόνα 16:** Ο ρόλος του TGF-β οδηγεί στη σπειραματοσκλήρυνση και διαμεσοσωληναριακή ίνωση στη νεφρική νόσο. Προκαλεί πάχυνση της ΣΒΜ μέσω ενεργοποίησης των κυττάρων να παράγουν εξωκυττάρια ουσία. Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που παρατηρούνται είναι η υπερτροφία, η απόπτωση, οι διαταραχές των ποδοκυττάρων, που οδηγούν σε μειωμένη σπειραματική διήθηση και απώλεια των σπειραματικών τριχοειδών, διαμεσοσωληναριακή ίνωση και σωληναριακή ατροφία οδηγώντας σε μόνιμη νεφρική δυσλειτουργία. EMT επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή. (τροποποιημένο από: doi: 10.1093/ndt/gft267)

## 7.1 Νεφρική Ίνωση

Είναι γενικά αποδεκτό ότι το μονοπάτι TGF-β1/Smad είναι σημαντικό για τη νεφρική ίνωση, παράγοντας εξωκυττάρια ουσία σε σπείραμα (σπειραματοσκλήρυνση) και σε

διαμεσοσωληναριακό χώρο (διάμεση ίνωση/σωληναριακή ατροφία). Στο ρόλο του περιλαμβάνεται επίσης η υπερπλασία, η διαφοροποίηση, η υπερτροφία, η απόπτωση, η αγγειογένεση, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η χημειοταξία και η αιμοποίηση. Σε πειραματικά και ανθρώπινα μοντέλα με νεφρική ίνωση, ανεξαρτήτως της αιτίας της χρόνιας νεφρικής νόσου, όπως διαβητική νεφροπάθεια [169,170], αποφρακτική νεφροπάθεια [171], 5/6 νεφρεκτομή [172], υπερτασική νεφροπάθεια [173] και σπειραματοπάθεια, όπως IgA νεφροπάθεια, ΕΤΣΣ, νεφρίτιδα του λύκου, μηνοειδική ΣΝ, το μονοπάτι TGF-β1 είναι ενεργοποιημένο. Διαγονιδιακά ποντίκια με αυξημένο κυκλοφορούντα παράγοντα TGF-β1 ανέπτυξαν σπειραματοσκλήρυνση και αυτά με αυξημένη σωληναριακή παραγωγή TGF-β1 παρουσίασαν διαμεσοσωληναριακή ίνωση χωρίς παρουσία επιπρόσθετης βλάβης [174]. Επιπλέον, ο ρόλος της Smad3 στη νεφρική ίνωση υποστηρίζεται, καθώς η γενετική αναστολή του Smad3 μειώνει την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία σε μονόπλευρη ουρητηρική απόφραξη [175].

## **7.2 Νεφρική Φλεγμονή**

Ταυτόχρονα, κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η αναστολή του TGF-β1 ως πιθανή θεραπευτική αντιμετώπιση, έχει αποτύχει να επιφέρει θετικά αποτελέσματα, λόγω της επιπλέον αντιφλεγμονώδους δράσης του. Ο TGF-β1 διαδραματίζει πολύπλοκο ρόλο στην ανοσολογική και φλεγμονώδη απάντηση [176]. Αρχικά, αυτό αποδεικνύεται, με το γεγονός ότι τα ποντίκια με έλλειψη TGF-β1 αναπτύσσουν μη ελεγχόμενη συστηματική φλεγμονώδη απάντηση και πεθαίνουν 3 εβδομάδες μετά τη γέννηση τους [177]. Επιπλέον, ο προστατευτικός ρόλος του διερευνήθηκε σε ανοσολογικά επαγόμενη νεφρική νόσο σε διαγονιδιακά TGF-β1 ποντίκια, χορηγώντας αντίσωμα έναντι της σπειραματικής βασικής μεμβράνης. Είναι ενδιαφέρον ότι τα ποντίκια που υπερεκφράζουν τη λανθάνον μορφή του TGF-β1 στα κερατινοκύτταρα παρουσιάζουν προστασία έναντι της νεφρικής ίνωσης σε πειραματική μηνοειδική ΣΝ. Αυτά τα ποντίκια είχαν αυξημένα επίπεδα λανθάνον και όχι ενεργού TGF-β1 στο πλάσμα και στο νεφρικό ιστό και επιπλέον αυξημένη έκφραση Smad7 [178].

## **7.3 TGF-β Σηματοδοτικό Μονοπάτι και Φλεγμονώδη Κύτταρα**

### **7.3.1. T κύτταρα**

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που υποστηρίζουν το ρόλο του TGF-β1 στη φλεγμονή, και προ- και αντι- φλεγμονώδη δράση. Από τη μία μεριά, ο TGF-β1 μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση του Foxp3+, υποκατηγορία των ρυθμιστικών T-κυττάρων (Treg), μέσω των οποίων καταστέλλεται η νεφρική βλάβη και από την άλλη μεριά επάγεται η διαφοροποίηση των T-κυττάρων σε T17 υπότυπο (Th17), τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή σε διάφορες ΣΝ [179]. Αυτά τα κύτταρα καλούνται Th17 κύτταρα, επειδή παράγουν ιντερλευκίνη-17. Τα Th17 κύτταρα επίσης παράγουν αυτοάνοση έναντι- MPO επαγόμενης ΣΝ μέσω της έκκρισης της IL-17. Πρόσφατα μια μελέτη έδειξε ότι είναι πιθανό να διαχωριστούν η ινωτική δράση του TGF-β1 από την αντιφλεγμονώδη δράση αποτρέποντας την αλληλεπίδραση με το διασταυρούμενο μονοπάτι Wnt/β-catenin , οδηγώντας έτσι σε ένα εν δυνάμει θεραπευτικό στόχο [180].

### **7.3.2. B κύτταρα**

Ο TGF-β1 εμποδίζει την ωρίμανση των B-κυττάρων με άμεσους ή και έμμεσους τρόπους προκαλώντας διαταραχές στην παραγωγή των αντισωμάτων ή προκαλώντας παραγωγή αυτοαντισωμάτων [181]. Καταστέλλει το μονοπάτι P13K/Akt και επάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου ειδικά στη G0/G1 φάση [182]. Επίσης επάγει την παραγωγή του ενεργοποιητικού παράγοντα των B-κυττάρων (BAFF) από τα μακροφάγα μέσω των Smad3/4 και PKA/CREB σηματοδοτικών μονοπατιών [183]. Ο BAFF αποτελεί κυτοκίνη που ρυθμίζει την ενεργότητα των B-κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου την υπερπλασία, διαφοροποίηση, απόπτωση και έκκριση ανοσοσφαιρινών. Υπερέκφραση του BAFF θα κατέστειλε την εξέλιξη των B-κυττάρων, οδηγώντας στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων στη IgA νεφροπάθεια και στη νεφρίτιδα του λύκου [181].

### **7.3.3. Μακροφάγα**

Τα μακροφάγα είναι πολύ ετερογενή κύτταρα και παρουσιάζουν ποικίλα λειτουργικά χαρακτηριστικά στην ιστική βλάβη. Η διήθηση των μακροφάγων έχει φανεί ότι σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νεφρικής βλάβης [184]. Τα μακροφάγα χωρίζονται σε 2 τύπους, τον προφλεγμονώδη M1-τύπο (κλασσικά ενεργοποιημένο) και τον αντιφλεγμονώδη M2-τύπο

(εναλλακτικά ενεργοποιημένο). Στην οξεία νεφρική βλάβη, στην αρχική φάση, υπάρχει στρατολόγηση των φλεγμονωδών κυττάρων και των μακροφάγων, τα οποία πολώνονται σε M1-τύπο από διάφορους φλεγμονώδεις παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου των Th17 κυττάρων, των οποίων η διαφοροποίηση επιτυγχάνεται από τον TGF-β1, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αναδεικνύοντας το ρόλο της χημειοταξίας. Ακολούθως, στη φάση αποκατάστασης της οξείας νεφρικής βλάβης το μονοπάτι του TGF-β1 μπορεί να προάγει την πόλωση των M2 μακροφάγων και να εκκριθούν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένου του TGF-β1. Παρόλο αυτά η εκλεκτική αναστολή του TGF-β1 από τα μακροφάγα σε ζωϊκό μοντέλο δε διαφοροποίησε την ίνωση [184,185,186].

#### **7.3.4. Αιμοπετάλια**

Τα αιμοπετάλια εκκρίνουν αγγειοδραστικούς, χημειοτακτικούς και μιτογόνους παράγοντες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με άλλους παράγοντες που παράγονται από τα νεφρικά ή φλεγμονώδη κύτταρα και συμβάλλουν στη σπειραματική βλάβη. Πιστεύεται ότι οι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο TGF-β1, παράγονται από τα αιμοπετάλια και από φλεγμονώδη κύτταρα και παίζουν σημαντικό ρόλο σε όλη τη διαδικασία.

#### **7.3.5. Ουδετερόφιλα**

Τα ουδετερόφιλα μπορούν να επάγουν και να ενισχύσουν φλεγμονώδεις απαντήσεις, απελευθερώνοντας προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο TGF-β1 [187]. Κατά τη φλεγμονή, ο TGF-β1 διευκολύνει την κυκλοφορία των ουδετεροφίλων, και επομένως εμποδίζοντας τον TGF-β1 κατευνάζεται η εισχώρηση των ουδετεροφίλων και η φλεγμονή [188]. Επιπλέον, η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού εμποδίζοντας την ενεργοποίηση της Smad3, έχει προταθεί ως πιθανός θεραπευτικός στόχος εναντίον της ίνωσης σε καταστάσεις όπου η φλεγμονή επάγεται από τα ουδετερόφιλα [189].

#### **7.3.6. Δενδριτικά**

Τα δενδριτικά κύτταρα διευκολύνουν τη νεφρική φλεγμονή προάγοντας την υπερπλασία και την ενεργοποίηση των CD8+ T κυττάρων [190]. Ο TGF-β1 προάγει την κυκλοφορία των δενδριτικών κυττάρων στην ίνωση και την επαγόμενη από τα δενδριτικά κύτταρα υπερπλασία και

ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Επιπλέον με έναν αυτοκρινή τρόπο ο TGF-β1 ενεργοποιεί την απελευθέρωση του από τα δενδριτικά κύτταρα [191].

#### **7.4 TGF-β Σηματοδοτικό Μονοπάτι και Ενδογενή Νεφρικά Κύτταρα**

Έχει φανεί ότι, ο TGF-β1 επηρεάζει διάφορα νεφρικά κύτταρα: μεσαγγειακά, ενδοθηλιακά, επιθηλιακά (ποδοκύτταρα), σωληναριακά κύτταρα και τύπου ινοβλαστών.

##### **7.4.1. Μεσαγγειακά κύτταρα**

Ο TGF-β1 προάγει τη σύνθεση κολλαγόνου τύπου I, III και IV, λαμινίνης, φμπρονεκτίνης και πρωτεογλυκάνες θειικής επαράνης από τα μεσαγγειακά κύτταρα, καθώς και παίζει ρόλο στη μεσαγγειακή υπερπλασία. Επομένως, ο TGF-β1 αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη συσσώρευση της εξωκυττάριας θεμέλειας ουσίας, με την ενεργοποίηση των μεσαγγειακών κυττάρων [192].

##### **7.4.2. Επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα)**

Τα ποδοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας και της λειτουργίας του σπειράματος. Παράγουν επίσης συστατικά της ΣΒΜ. Έχει φανεί ότι η αυξημένη έκφραση του TGF-β1 στα ποδοκύτταρα προκαλεί την απόπτωση τους [193,194]. Επιπροσθέτως, σε αυτά τα τραυματισμένα ποδοκύτταρα η έκφραση της Smad7 είναι έντονη. Επίσης, in vitro πειράματα έχουν δείξει ότι μετά τη βλάβη ο TGF-β1 επάγει τη μεσεγγυματική μετάβαση των ποδοκυττάρων [153].

##### **7.4.3. Ενδοθηλιακά κύτταρα**

Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο TGF-β1 προάγει τη μεσεγγυματική μετάβαση των ενδοθηλιακών κυττάρων, την κυτταρική υπερπλασία και την απόπτωση. Αυτές οι αλλαγές συμβάλλουν σε πρωτεϊνουρία, φλεγμονή και σπειραματοσκλήρυνση. Πρόσφατα περιγράφηκε ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα αντιδρούν διαφορετικά σε έλλεψη της Smad3, σε αντίθεση με τα ποδοκύτταρα. Επομένως, οι αλλαγές στα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως οίδημα, εκφυλισμός και αναδίπλωση της ΣΒΜ εμφανίζονται να είναι Smad3 εξαρτώμενα, σε αντίθεση με τα ποδοκύτταρα [195].

#### **7.4.4. Σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα**

Η έκφραση του TGF-β1 έχει επίσης συσχετιστεί με την εκφύλιση των σωληναρίων, προκαλώντας ατροφία [196]. Παρόλο αυτά, πρόσφατα ανακαλύφθηκε η προστατευτική δράση του TGF-β1 στο εγγύς σωληνάριο. Σε ζωϊκό μοντέλο χρόνιας νεφρικής νόσου, καταγράφηκε ότι η εκλεκτική διαγραφή του TβRII από το εγγύς σωληνάριο επιδείνωσε τη σωληναριακή ατροφία. Το παραπάνω σημειώθηκε εν μέρει λόγω μειωμένης δράσης b-κατχερίνης ή μέσω της ευεργετικής δράσης του TGF-β1 στην αυτοφαγία. Επίσης, πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι το μονοπάτι TGF-β1 μειώνει την έκφραση της Κλωθούς, η οποία παράγεται στο εγγύς σωληνάριο [197].

#### **7.4.5. Κύτταρα τύπου ινοβλαστών**

Τα ενδονεφρικά κύτταρα τύπου ινοβλαστών, συμπεριλαμβανομένου τους ινοβλάστες του διάμεσου χώρου και τα περικύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι του TGF-β1, ώστε να αλλάξουν το φαινότυπο τους σε μυοϊνοβλαστικό. Έχει αποδειχτεί ότι τα τραυματισμένα επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν τον TGF-β1 και επάγουν τη μεσεγχυματική μετάβαση των παρακείμενων περικυττάρων [198].



## 8. ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TGF-β/SMAD ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΣΤΗ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΗΣΗ ΤΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Ο TGF-β διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια και την πρόοδο της νεφρικής βλάβης [199]. Εκτεταμένες μελέτες σε πειραματόζωα και σε ανθρώπινα δείγματα έχουν δείξει τη σημασία του TGF-β στη νεφρική ίνωση η οποία υποστηρίζεται και από *in vitro* μελέτες που δείχνουν ότι ο παράγοντας αυτός όχι μόνο αυξάνει την ποσότητα της εξωκυττάριας ουσίας, αλλά επίσης αναστέλλει και την αποδόμηση της αναστέλλοντας τις μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (MMP) και ενεργοποιώντας τον ιστικό αναστολέα (TIMP) αυτών [200,201]. Η υπερέκφραση του TGF-β με την εισαγωγή του cDNA του στο νεφρό επίμυος οδηγεί στη σπειραματοσκλήρυνση [202]. Η πηγή προέλευσης του TGF-β μπορεί να είναι τα νεφρικά παρεγχυματικά κύτταρα, λευκοκύτταρα, ή και ο TGF-β της συστηματικής κυκλοφορίας [201, 202]. Η υπερέκφραση των ισομορφών του TGF-β καθώς και των υποδοχέων του έχει καταγραφεί στο παρελθόν τόσο στις ανθρώπινες ΣΝ [201,202,203] όσο και στην πειραματική ΣΝ [148,204,205].

Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι η έλλειψη της Smad4 εμποδίζει την από τον TGF-β επαγόμενη σύνθεση του κολλαγόνου [206]. Επίσης, ινοβλάστες από έμβρυα ποντικού που δεν εκφράζουν τη Smad3 δεν μπορούν να συνθέσουν κολλαγόνο τύπου I και III [207]. Η έκφραση της MMP-2 έχει ως μεσολαβητή τη Smad2, ενώ η έκφραση της Smad7 τη Smad3 [208]. Ακόμη, η αναστολή της έκφρασης της MMP-1 και η επαγωγή του TIMP-1 διαμεσολαμβάνονται από τη Smad3 [208]. Σε ασθενείς με ΕΤΣΣ έχει φανεί ότι είναι αυξημένο το σύμπλοκο Smad2/3 στα κύτταρα που περιβάλλουν τις σκληρυντικές βλάβες [209]. Ακόμη, ποντίκια που δεν εκφράζουν τη Smad3 προστατεύονται από τη νεφρική ίνωση που επάγεται από την αγγειοτασίνη II, τη διαβητική νεφρική νόσο και την ετερόπλευρη ουρητηρική απόφραξη [174]. Η υπερέκφραση της Smad7 σε νεφρικά σωληναριακά κύτταρα ανέστειλε την από τον TGF-β επαγόμενη EMT καθώς και την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας μέσω της αναστολής της φωσφορυλίωσης των Smad2/3 [210]. Πολύ σημαντικό ρόλο στη Smad σηματοδότηση φαίνεται να παίζει και η διασταυρούμενη συνομιλία τους (cross-talk) με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι Smads δρουν ως σηματοδοτικοί ολοκληρωτές (integrators). Πρόσφατα δείχθηκε ότι διάφοροι προϊνωτικοί παράγοντες όπως τα τελικά προϊόντα προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) και η αγγειοτενσίνη II επάγουν τη σύνθεση

κολλαγόνου στα μεσαγγειακά, τα σωληναριακά αλλά και τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα ενεργοποιώντας τις Smads πρωτεΐνες τόσο μέσω του TGF-β όσο και ανεξάρτητα από αυτόν [211, 212]. Φαίνεται πως η ενεργοποίηση των ERK και p38MAP κινασών είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση των Smads από τους παράγοντες αυτούς καθώς το φαινόμενο αυτό μπορεί να ανασταλεί με τη χρήση αναστολέων της ERK1/2 ή της p38. Όσον αφορά τη διατήρηση του νεφρικού μικροαγγειακού περιβάλλοντος έχει καταγραφεί ότι ο TGF-β ασκεί αγγειογενετικές και αντιαγγειογενετικές επιδράσεις μέσω διακριτών ρόλων των Smads. Έτσι, η Smad3 διαμεσολαβεί την από τον TGF-β επαγόμενη έκφραση του VEGF, ενώ η Smad2 αναστέλλει την αγγειογένεση μέσω της έκφρασης της θρομβοσπονδίνης-1 (αντιαγγειογενετικός παράγοντας) και του sFlt-1 (διαλυτός υποδοχέα του VEGF-A) [212].

Παρότι οι περισσότερες ενδείξεις συνηγορούν υπέρ της βλαπτικής επίδρασης του TGF-β και συνεπώς και των Smads στο νεφρό, εντούτοις λίγη σημασία έχει δοθεί στις αντιφλεγμονώδεις και ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες τους. Η αναστολή της δράσης του με τη χρήση αντισωμάτων αναστέλλει την ανάπτυξη της νεφρικής ίνωσης στο μοντέλο της διαβητικής νεφροπάθειας επίμυος και της νεφροπάθειας από πουρομυκίνη στα ποντίκια αυξάνοντας όμως παράλληλα την πρωτεϊνουρία και την αλβουμινουρία [213, 214]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως ο TGF-β έχει κάποιες ευεργετικές επιδράσεις στα νεφρικά νοσήματα. Για παράδειγμα, εμπλέκεται στην αποδρομή της νεφρικής βλάβης και την επαγωγή του σχηματισμού του αυλού των πειραματικών τριχοειδών καθώς και της απόπτωσης στα μεσαγγειακά κύτταρα στο μοντέλο της anti-Thy1 νεφρίτιδος [171, 215]. Ο TGF-β έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες μέσω της ικανότητας του να μπλοκάρει την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του NF-κB από την ιντερλευκίνη IL-1β και τον TNF-α [216]. Επίσης, αναφέρεται ότι ο TGF-β έχει συνεργική δράση με τα γλυκοκορτικοειδή, αποσκοπώντας στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες τους [217]. Το πώς ακριβώς ο TGF-β ρυθμίζει την ανοσολογική αντίδραση παραμένει ελάχιστα κατανοητό. Η Smad3 φαίνεται να ενεργοποιεί τον toll-like receptor 4 (TLR4) και να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων καθώς και την προσέλκυση των λευκοκυττάρων αναστέλλοντας την έκφραση της monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) και μορίων προσκόλλησης [218-220]. Έχει επίσης φανεί ότι η υπερέκφραση της Smad7 είναι ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου TGF-β διαγονιδιακά ποντίκια προστατεύονται από τη νεφρική φλεγμονή σε διαβητικά μοντέλα και σε μοντέλα ετερόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης [147]. Η υπερέκφραση της Smad7 επάγει την έκφραση του IκBa, ενός αναστολέα του NFκB,

αναστέλλοντας έτσι την ενεργοποίηση του NFκB από την IL-1 και τον TNF- α [221]. Συνεπώς, η αναστολή του NF-κB φαίνεται να είναι ο κεντρικός μηχανισμός με τον οποίο η Smad7 αναστέλλει τη νεφρική φλεγμονή [222].

### **8.1 Ο ρόλος του TGF-β1 στη διαμεσολάβηση της νεφρικής βλάβης**

Ο TGF-β είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική ανάπτυξη, την ιστική επιδιόρθωση και διατήρηση των λειτουργιών. Σε φυσιολογικό ανθρώπινο νεφρό παρατηρείται σπειραματική έκφραση TGF-β2 και TGF-β3 κυρίως στα ποδοκύτταρα, ενώ ο TGF-β1 παρατηρείται κυρίως στα σωληνάκια και όχι στο σπείραμα [223]. Είναι γνωστός και ως αντιφλεγμονώδη κυτοκίνη [224]. Ασκει την αντιφλεγμονώδη δράση μέσω αναστολής της μιτογένεσης και της απάντησης των κυτοκινών στα σπειραματικά κύτταρα και την καταστολή των διηθούμενων κυττάρων. Η απάλειψη του γονιδίου TGF-β1 σε ποντίκια (Knock-out) οδήγησε σε φλεγμονή πολλαπλών οργάνων, ενώ τα ποντίκια που γεννήθηκαν με γενετικό έλλειμμα πέθαναν μέσα σε 3 εβδομάδες από τη γέννηση τους. Αντίθετα, ποντίκια τα οποία παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα TGF-β1 (λανθάνον σύμπλοκο) ήταν προστατευμένα έναντι της νεφρικής ίνωσης και της προοδευτικής φλεγμονής σε αποφρακτική ουροπάθεια και σε ανοσολογικά επαγόμενη ΣΝ. Αν και η αναστολή της επαγόμενης φλεγμονής του TGF-β1 μέσω του NF-κB από τη δράση της Smad7 έχει ανακαλυφθεί πρόσφατα, ο ακριβής μηχανισμός για την αντιφλεγμονώδη δράση παραμένει άγνωστος.

Υπάρχουν εκτεταμένα στοιχεία για το ρόλο του TGF-β1 στην παθογένεια των νεφρικών παθήσεων σε ζωικά μοντέλα και σε ανθρώπους. Ο κεντρικός ρόλος του TGF-β1 στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή των κυττάρων (EMT) και στη νεφρική ίνωση έχει εξακριβωθεί από πειράματα, όπου επιβεβαιώνεται η δυνατότητα της πρωτεΐνης ντεκορίνη (decorin) να αναστέλλει τον TGF-β1 και χρησιμοποιώντας το αντίσωμα να μειώνει τη νεφρική ίνωση. Επιπλέον έχει φανεί ότι ο TGF-β1 είναι κύριος ρυθμιστής στην παθογένεια της σπειραματοσκλήρυνσης σε ασθενείς με σπειραματικές παθήσεις, όπως IgA νεφροπάθεια, ΕΤΣΣ, νεφρίτιδα του λύκου, μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια, διαβητική νεφροπάθεια και ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα. Σημαντική ρύθμιση προς τα πάνω και των τριών ισομορφών TGF-β, όπως και των υποδοχέων TGFβRI και TGFβRII έχει βρεθεί στο σπείραμα και στο σωληναριο-διάμεσο χώρο σε νεφρικές

παθήσεις [224]. Επιπλέον τα επίπεδα του TGF-β στα ούρα είναι αυξημένα και σχετίζονται με τη σοβαρότητα της διάμεσης ίνωσης και της μεσαγγειακής ουσίας σε ασθενείς με νεφρικές παθήσεις. Σε σχέση με υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με πειραματικές παθήσεις χωρίς πρωτεϊνουρία, τα επίπεδα του TGF-β στα ούρα είναι αυξημένα σε ασθενείς μόνο με πρωτεϊνουρία λόγω πειραματικής βλάβης [225]. Επίσης, σε πειραματικές παθήσεις με βλάβη των ποδοκυττάρων, έχει παρατηρηθεί έκφραση του TGF-β στα ποδοκύτταρα σε παθήσεις όπως IgA Νεφροπάθεια, ΕΤΣΣ και διαβητική νεφροπάθεια [226]. Στη διαβητική νεφροπάθεια έχει φανεί σε ζωικά μοντέλα και σε ανθρώπους σωληναριακή και πειραματική έκφραση του TGF-β και αυτή η έκφραση σχετίζεται με το γλυκαιμικό έλεγχο [227].

## **8.2 Ο ρόλος της SMAD3 στη διαμεσολάβηση της νεφρικής βλάβης**

Στη νεφρική ίνωση η Smad3 είναι ενεργοποιημένη και σε ζωικά μοντέλα και σε ανθρώπους με χρόνια νεφρική νόσο διαφόρων αιτιών, όπως η υπερτασική νεφροσκλήρυνση [228-230], αποφρακτική νεφροπάθεια [222], διαβητική νεφροπάθεια [223-225], νεφροπάθεια σχετιζόμενη με φάρμακα [231] και χρόνια νεφροπάθεια του μοσχεύματος [232]. Το μονοπάτι TGF-β/Smad3 στοχεύει στην ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με την ίνωση όπως πρωτεογλυκάνες, ιντεγκρίνες, CTGF (αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού) [233,234]. Ο απαραίτητος ρόλος της Smad3 στη νεφρική ίνωση επιβεβαιώνεται καθώς η ίνωση μειώνεται σε αρουραίους που τους έχει αφαιρεθεί το αντίστοιχο γονίδιο, όταν πάσχουν από διαβητική νεφροπάθεια [234] και από νεφροπάθεια που σχετίζεται με φάρμακα [235, 236]. Επιπλέον αναστολή της φωσφορυλίωσης και της πυρηνικής μετατόπισης της Smad3 έχει δείξει να μειώνει τη διαμεσοσωληναριακή ίνωση σε αρουραίους με μονόπλευρη αποφρακτική νεφροπάθεια. Νέος θεραπευτικός στόχος στη διαβητική νεφροπάθεια αποτελεί η αναστολή του Smad3 μονοπατιού με σκοπό τη μείωση της νεφρικής ίνωσης [237,238]. Επίσης, έχουν συσχετιστεί τα αυξημένα επίπεδα ούρων Smad3 σε ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια με μικρότερο ρυθμό πειραματικής διήθησης (GFR) [240]. Επίσης πρόσφατη μελέτη αποδεικνύει ότι η αγγειοτενσίνη II επάγει τη νεφρική ίνωση μέσω του μονοπατιού TGF-β1/Smad3 και τη φλεγμονή μέσω του πυρηνικού παράγοντα NF-κB στην υπερτασική νεφροπάθεια [241]. Τέλος, έχει φανεί ότι η αναστολή της έκφρασης του TGF-β1 και της φωσφορυλίωσης Smad2/3, καθώς και η αυξημένη έκφραση της

Smad7 στο νεφρό μειώνει την εναπόθεση ανοσολογικών συμπλεγμάτων, επιδιορθώνει τη βλάβη των ποδοκυττάρων και αποτρέπει τη διάμεση ίνωση [242].

### **8.3 Ο ρόλος της SMAD7 στη διαμεσολάβηση της νεφρικής βλάβης**

Η έκφραση της Smad7 επάγεται από τον TGF- $\beta$  δημιουργώντας έτσι ένα μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative-feedback loop) και προστατεύει από την ίνωση εμποδίζοντας την φωσφορυλίωση των Smad2 και Smad3 [138]. Σε μοντέλα νεφρίτιδας anti-Thy1 με οξεία νεφρική βλάβη, χρόνια νεφροπάθεια του μοσχεύματος και αποφρακτική νεφροπάθεια, η έκφραση της Smad7 είναι ρυθμισμένη προς τα κάτω και έτσι επάγεται η ίνωση μέσω του TGF- $\beta$ 1 [242, 243]. Στη χρόνια νεφρική νόσο η αγγειοτενσίνη II και ο TGF- $\beta$ 1 ενεργοποιούν τις πρωτείνες Smurfs και την αρκάδια πρωτεΐνη μειώνοντας τη δράση της Smad7 [240]. Επιπλέον ποντίκια χωρίς το γονίδιο Smad7 εμφανίζουν πιο σοβαρή ίνωση σε διαβητική και αποφρακτική νεφροπάθεια [243,244]. Η απώλεια της Smad7 όμως δεν προάγει μόνο την ίνωση μέσω του TGF- $\beta$ /Smad αλλά ενισχύει και τη φλεγμονή μέσω του μονοπατιού NF- $\kappa$ B [244,245]. Η ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B, που προωθεί τη νεφρική φλεγμονή, έχει παρατηρηθεί σε αποφρακτική νεφροπάθεια, διαβητική νεφροπάθεια και σε σπειραματονεφρίτιδα [147, 245, 246, 247]. Ο ρόλος της Smad7 στο μονοπάτι που διασταυρώνεται (crosstalk) με τον παράγοντα NF- $\kappa$ B στη νεφρική φλεγμονή έχει επιβεβαιωθεί στην υπερτασική νεφροπάθεια [228] αποφρακτική νεφροπάθεια [248] και διαβητική νεφροπάθεια [249] με την ικανότητα της Smad7 να εμποδίζει την ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B. Σε Smad7 knock-Out ποντίκια με μονόπλευρη αποφρακτική νεφροπάθεια και σε διαβητική νεφροπάθεια παρουσιάζεται σοβαρή φλεγμονή [250]. Αντίθετα, η υπερέκφραση της Smad7 στα μεσαγγειακά, σωληναριακά και αγγειακά κύτταρα του λείου μυϊκού χιτώνα αναστέλλει το μονοπάτι TGF- $\beta$ /Smad και μειώνει την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας [251,252,253]. Η θεραπευτική δράση της Smad7 στη φλεγμονή και την ίνωση του νεφρού έχει ερευνηθεί σε αρουραίους με υπερτασική νεφροσκλήρυνση [228, 230], αποφρακτική νεφροπάθεια [254], διαβητική νεφροπάθεια [255] και λειτουργικό μονόνεφρο [256]. Η πρωτεΐνη Smad7 χρησιμοποιήθηκε ως γονιδιακή θεραπεία και παρατηρήθηκε όχι μόνο αναστολή της ίνωσης μέσω της αναστολής της Smad3 αλλά και της φλεγμονής μέσω του NF- $\kappa$ B, όπως επιβεβαιώθηκε με τη σημαντική μείωση στο σπειραματικό και διαμεσοσωληναριακό χώρο μακροφάγων, T-κυττάρων, IL-1, ICAM-1, TNF- $\alpha$  και iNOS [257].

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο αυξητικός μετατρεπτικός παράγοντας β1 (TGF-β1) θεωρείται μια πολυπαραγοντική κυτοκίνη, η οποία έχει φανεί να συμμετέχει στην παθογένεια της ίνωσης αλλά και της φλεγμονής του νεφρού, καθώς δρα και ως αντιφλεγμονώδη κυτοκίνη και ρυθμίζει αρνητικά τη φλεγμονή [224]. Η ίνωση αποτελεί διαδικασία επιδιόρθωσης και ανακατασκευής, σε απάντηση στο αρχικό νεφρικό ερέθισμα αλλά και συνεπακόλουθο στάδιο της παρατεταμένης μη θεραπευθείσας φλεγμονής και κατά συνέπεια αποτελεί κοινό παθοφυσιολογικό μηχανισμό στη χρόνια νεφρική νόσο οποιασδήποτε αιτιολογίας. Η χρόνια νεφρική νόσος επηρεάζει περίπου το 10% συνολικά του πληθυσμού με υψηλή θνητότητα να καταγράφεται και με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές να διατίθενται. Λόγω της πληθώρας των υποκείμενων νεφρικών νόσων, συμπεριλαμβανομένου τις σπειραματικές παθήσεις, ο θεραπευτικός στόχος έναντι της ίνωσης, το τελικό κοινό μονοπάτι της εξελισσόμενης βλάβης, παραμένει μια ενδιαφέρουσα και σημαντική προοπτική.

Ο TGF-β1 δρα μέσω ενός κανονικού σηματοδοτικού μονοπατιού (όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος) και περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των Smad2 και Smad3 (pSmad3), τα οποία στη συνέχεια μετατοπίζονται στον πυρήνα και ακολουθεί η μεταγραφή διαφόρων γονιδιακών στόχων. Η Smad7 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστικό παράγοντα του TGF-β1/Smad σηματοδοτικού μονοπατιού, και επίσης αλληλεπιδρά επιπλέον με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία συμμετέχουν στη φλεγμονή (NF-κB μονοπάτι) [141].

Ο TGF-β1 εκφράζεται έντονα σε ποικιλία νεφρικών νοσημάτων, όπως έχει καταγραφεί κυρίως σε πειραματικά και ζωϊκά μοντέλα, επηρεάζοντας κύτταρα του σπειράματος (ποδοκύτταρα, μεσαγγειακά, ενδοθηλιακά, τοιχωματικά), σωληναριακά κύτταρα, κύτταρα περισωληναριακών τριχοειδών και περικύτταρα [142,143]. Πρόσφατες μελέτες κατέγραψαν νέους μηχανισμούς (εκτός από την υπερπλασία, διαφοροποίηση, υπερτροφία, απόπτωση και αγγειογένεση), με τους οποίους προκαλείται η νεφρική βλάβη, όπως είναι η χημειοταξία των μακροφάγων και η μετατροπή τους σε μεσεγχυματικό τύπο και επιγεννητικές τροποποιήσεις του DNA και πρωτεϊνών ιστόνης [144,145]. Η ποικιλομορφία αυτών των δράσεων οφείλεται εν μέρει στην αλληλεπίδραση του TGF-β1 σηματοδοτικού μονοπατιού με άλλα μονοπάτια ή και στις διαφορετικές κυτταρικές απαντήσεις που προάγονται από τον TGF-β1 αναλόγως τον τύπο κυττάρου και το

μικροπεριβάλλον που δρα. Τα δεδομένα για την έκφραση και λειτουργία των Smad πρωτεϊνών στις νεφρικές παθήσεις είναι περιορισμένα.

Θεραπευτικές επιλογές βασιζόμενες στην αναστολή του TGF-β1/Smad σηματοδοτικού μονοπατιού έχουν περιγραφεί να αναστέλλουν τη νεφρική βλάβη και την ίνωση σε ζωϊκά μοντέλα, ενώ η υπερέκφραση του TGF-β1 να επάγει τη νεφρική ίνωση. Κλινικές μελέτες με στόχο τον TGF-β1 δεν επέφεραν όμως ευνοϊκά αποτελέσματα, αποδεικνύοντας έτσι τον πολύπλοκο ρόλο του στη νεφρική νόσο [258,173, 259, 260]. Θεραπευτική κατεύθυνση προς τους αποδέκτες του σηματοδοτικού μονοπατιού, όπως οι πρωτεΐνες Smad3, Smad4, Smad7 αποτελούν μία καλύτερη προσέγγιση [238].



## 2.ΣΚΟΠΟΣ

Η εξισορρόπηση του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF-β1/pSmad3/Smad7 έχει φανεί να αποτελεί ένα μηχανισμό κλειδί, που μπορεί να προσφέρει αποτελεσματική θεραπευτική απάντηση εναντίον της φλεγμονής και της ίνωσης σε νεφρικά νοσήματα όπως η διαβητική νεφροπάθεια όπου εκεί βέβαια η ίνωση υπερέχει [258]. Στις πειραματικές παθήσεις, όπου η φλεγμονή και η ίνωση συνυπάρχουν, οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad7 πιθανώς να ακολουθούν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης, όπως λίγες μελέτες έχουν αναδείξει [261,262]. Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του TGF-β1 και του Smad μονοπατιού, μελετήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση των TGF-β1, pSmad3 και Smad7 συγκεκριμένα στην παθολογία της πειραματονεφρίτιδας. Επιπλέον, εξετάσαμε τη μεταξύ τους εκφραστική σχέση και αλληλεπίδραση, την επίδραση της ταυτόχρονης έκφρασης και το ρόλο τους στην εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής νόσου και σε χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου.

### Ερωτήματα

- 1.Είναι ενεργοποιημένο το μονοπάτι TGF-β1 μέσω των πρωτεϊνών Smad στις πειραματικές παθήσεις και εάν ναι πως σχετίζεται με την παθολογία και την εξέλιξη της νεφρικής νόσου;
- 2.Διαφέρει η έκφραση (ένταση και έκταση) σε κάθε πειραματική πάθηση;
- 3.Ποιος ο ρόλος της pSmad3 και Smad7 στις πειραματικές παθήσεις;

### 3.ΥΛΙΚΟ

Συμπεριλάβαμε 50 ασθενείς με πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή σπειραματονεφρίτιδα (ΣΝ), οι οποίοι υποβλήθηκαν σε βιοψία νεφρού με βάση κλινικών ενδείξεων και παρακολουθούνται στο Νεφρολογικό Τμήμα και Μονάδα Κλινικής Ανοσολογίας-Ρευματολογίας, Β΄ Παθολογική Κλινική ΕΚΠΑ, Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ιπποκράτειο» κατά τη διάρκεια 2015-2019. Η μελέτη εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου (3424/14-3-2018) και την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας (3424/02-3-3018). Οι βιοψίες ταξινομήθηκαν με βάση τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά στα ακόλουθα: 1. IgA Νεφροπάθεια, IgAN (14 βιοψίες). 2. Μη υπερπλαστική ΣΝ/ Ποδοκυττοπάθειες [ιδιοπαθής μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια, MN (12 βιοψίες), εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, ΕΤΣΣ (4 βιοψίες) και νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων ΝΕΑ (2 βιοψίες)] 3. Υπερπλαστική ΣΝ [ANCA-σχετιζόμενη ΣΝ (11 βιοψίες), ΣΝ σχετιζόμενη με τον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο κατά ISN/RPS 2004 ταξινόμηση, ΝΛ (τάξη ΙΙΙ ή ΙV 6 βιοψίες, τάξη V 1 βιοψία)].

Πέντε δείγματα από φυσιολογικό νεφρικό ιστό, τα οποία αφαιρέθηκαν από ασθενείς με νεφρικό όγκο, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Ως υγιείς μάρτυρες παρουσίασαν αρτηριακή πίεση <140/90mmHg, eGFR $\geq$ 90ml/min/1.73m<sup>2</sup>, χωρίς ενεργό ίζημα ή πρωτεϊνουρία.

#### 4.ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Αρχικά, για κάθε ασθενή συλλέχθηκαν δημογραφικά στοιχεία, όπως ηλικία, εθνικότητα, φύλο, ημερομηνία βιοψίας και χρόνος παρακολούθησης. Επιπλέον, κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία κατά τη διάγνωση, όπως διαστολική και συστολική αρτηριακή πίεση, αιμοσφαιρίνη (g/dL), αιματουρία (αιματουρία>5 ερυθροκύτταρα/ανά οπτικό πεδίο, και/ή κυτταρικός κύλινδρος), πρωτεϊνουρία σε γρ/24ώρο, κρεατινίνη ορού (mg/dL), eGFR (εκτιμώμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης με βάση την εξίσωση CKD-EPI) και τέλος επίπεδα στον ορό συμπληρώματος (C ) 3 και 4 (mg/dL). Στο τέλος της παρακολούθησης καταγράφηκαν επίσης το επίπεδο της κρεατινίνης, eGFR και της πρωτεϊνουρίας, η ύφεση (πλήρης/μερική ή όχι), επεισόδια υποτροπών, εξέλιξη στη ΧΝΝ (οριζόμενη με τα κριτήρια KDIGO 2012-ως πτώση στην κατηγορία του GFR G1 μέχρι G5, συνοδευόμενη με μείωση  $eGFR \geq 25\%$  από την αρχική τιμή αναφοράς), χρόνια νεφρική νόσος τελικού σταδίου (ΧΝΝΤΣ-οριζόμενη ως  $eGFR < 15 \text{ ml/min/1.73m}^2$  ή ανάγκη αιμοκάθαρσης) και θάνατος (Εικόνα 17).

	CG	CH	CI	CJ	CK	CL	CM	CN	CO	CP	CQ	CR	CS	CT	CU	
1	ρ αναδ3 παθωνση παφιδωτικος εφες 0 οχι 1 ναι	ρ αναδ3 παφιδωτικος ιωση 0 οχι 1 ναι	ρ αναδ3 χρονη κωτ μυνοειδωσπειρα ματος 1, κωτ μυνοειδωσπειρα ματος 2, κωτ μυνοειδωσ και οχι σπειραματος 3, κωτ μυνοειδωσ σπειραματος 4	ρ αναδ3 ενωση βρωμης εσο σουλφοναο ορυνησι 0 οσθησι 1 μειρα 2 ένωση 3	ρ αναδ3 ενωση χρονης στη διαμεση φιλωγωνη αργησι 0 οσθησι 1 μειρα 2 ένωση 3	παρτηρησις	ρ αναδ7 ενωση βρωμης εσο σπειραμα αργησι 0 οσθησι 1 μειρα 2 ένωση 3	επιμακ 1 δωγωνο 2	ρ αναδ7 μωγγωσιαι κωτ 0 οχι, 1 ναι	ρ αναδ7 ελεβοθλασι κωτ 0 οχι, 1 ναι	ρ αναδ7 μωγγωσιαι 0 οχι, 1 ναι	ρ αναδ7 μωγγωσιαι κωτ 0 οχι, 1 ναι	ρ αναδ7 μωγγωσιαι 0 οχι, 1 ναι	ρ αναδ7 μωγγωσιαι κωτ 0 οχι, 1 ναι	ρ αναδ7 μωγγωσιαι κωτ 0 οχι, 1 ναι	ρ αναδ7 μωγγωσιαι κωτ 0 οχι, 1 ναι
2																
3	0	0	1	2	λεμφοκυτταρα κυριας δωσιωσ	2	2	1	1	1	1	1	2,1	-	-	
4	0	-	1	0		1	1	0	1	0	0	0	1	-	-	
5		0	2	-	επιμακ σουλφοναο και παδωνιτωρα σπειρα	3	2	1	1	1	1	1	1,2,3,4	-	-	
6			3	3	υπιδωρι, τυπωσιαι σκλθρωση	3	2	1	1	1	1	1	1,2,3,4	-	-	
7			1	-	λεμφοκυτταρα κυριας	1	1	1	1	0	0	0	1,2,4	-	-	
8		0	1	0		3	2	1	1	1	1	1	1,2,3,4	-	-	

	BL	BM	BN	BO	BP	BQ	BR	BS	BT	BU	BV	BW	BX	BY	BL	CA
35	3	0	0	1	0	0	3	3	1	1	0-1	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	2,3	2	2	1	1
37	0	1	3	2	0	0	3	0	-	-	-	2	2	2	1	1
38	3	0	0	3	2	0	3	3	1	1	0-1	0	0	0	0	0
39	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	3	3	2	1	1
40	2	2	2	2	2	2	0	0	-	-	-	3	3	2	1	1
41	0	1	3	1	0	0	3	1	-	-	0-1	0	0	0	0	0
42	0	0	3	3	0	0	3	0	-	-	-	2,3	0	0	0	0
43	0	0	3	2	0	0	2	0	-	-	-	2,3	2	2	1	1
44	0	0	2	2	0	0	2	0	-	-	-	2,3	2	2	1	1
45	3	0	0	3	0	0	3	3	1	1	1	0	0	0	0	0

	H	I	J	K	L	M	N	U	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	
1	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	TGF-β1 ένωση ου	LAST FOLLOW-UP ημερ	FOLLOW-UP μην	ΛΕΥΚΩΜΑ/24h/gr προ Θεραπειας	ΑΙΜΑΤΟΨΗΦΑ 1 yes 0 no προ Θεραπειας	CRP mg/dl προ Θεραπειας	ΑΠ προ Θεραπειας 1 yes 0 no	hgb/dl προ Θεραπειας	c3 diagnosis (75-180 mg/dl)	c4 diagnosis (10-40 mg/dl)	CRPmg/dl μετά Θεραπειας	ΛΕΥΚΩΜΑ/24h/gr μετά Θεραπειας	ΑΠ μετά Θεραπειας 1 yes 0 no	ΥΦΕΣΗ 0 οχι 1 ναι 2 μερωι οφειση	CKD 0 no 1 yes	ESRD 1 yes 0 no	survival 0 no 1 yes	ΥΠΟ 0 no 1 yes
2	IgA	0	14/7/2020	56	0.3	1	0.9	0	12.6	112	17	1.3	0.2	1	1	1	0	1	
3	MN	1	29/2/2020	50	8	0	1.1	1	12.4	114	29.6	1.09	0.1	1	1	0	0	1	
4	MCD	1	10/10/2020	64	20	0	0.8	1	54.1	212	42.6	0.92	0.2	1	1	0	0	1	
5	PGSS	2	10/10/2020	64	30	0	1.8	1	12.1	101	24.9	1.1	0.2	1	1	0	0	1	
6	IgA	0	1/2/2017	12	0.15	1	0.8	1	13.4	120	27.7	0.8	0.1	1	1	0	0	1	
7	IgA	2	10/10/2020	46	0.8	1	0.8	0	12.8	94	20	0.6	0.2	0	1	0	0	1	
11	ANCA	2	25/1/17	10	3	1	5.1	1	12.4	82	18	5	3	1	0	1	1	0	
12	ANCA	1	10/10/2020	46	1.9	1	11.4	1	10.2	21	2.9	2.6	2.8	1	1	1	0	1	
13	MN	1	19/3/2020	45	4.9	0	0.9	0	12	137	35	0.9	0.36	1	1	0	0	1	
14	MN	1	10/2017	12	12	0	2.9	1	10.8	126	30	3.1	14	1	0	1	0	1	
15	PGSS	1	15/1/2020	42	8.9	0	0.7	0	12.3	126	23	0.89	0.3	0	1	0	0	1	
16	PGSS	1	11/3/2020	41	20	1	0.7	0	10.6	99	17.4	0.55	0.14	0	1	0	0	1	
17	ΣΕΑ III-V	1	12/2/2020	40	9	1	0.6	0	11.4	51	4.8	0.6	1.3	0	2	0	0	1	
18	IgA	1	23/5/2019	19	1.6	0	1.2	0	14.4	112	20.3	1.3	1.4	0	0	1	0	1	
19	IgA	1	20/10/2020	38	3.4	1	0.8	0	12.1	136	27	1	0.54	0	1	0	0	1	

Εικόνα 17. Στιγμιότυπο από τη συνολική καταγραφή των στοιχείων από το σύνολο των ασθενών σε Excel.

## **5.ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **5.1. Βιοψίες Νεφρού**

Η βιοψία νεφρού πραγματοποιήθηκε στο Νεφρολογικό Τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ιπποκράτειο» καθοδηγούμενη με υπέρηχο (real-time ultrasound guided), με παρακέντηση με βελόνα 16G με αυτόματο σύστημα (Bard, Covington, GA, USA) και στη συνέχεια παρασκευάστηκε για εξέταση στο οπτικό μικροσκόπιο, στον ανοσοφθορισμό και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στο Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, ΕΚΠΑ. Ακολούθησε η λήψη ιστικών τομών παραφίνης για τη διενέργεια χρώσης ρουτίνας με ειδικές ιστοχημικές χρώσεις, όπως αιματοξυλίνης και εωσίνης (A&E), περιοδικού οξέος-Schiff (PAS), χρώση αργύρου και τρίχρωμη Masson. Επιπλέον, σε τομές κρουστάτη διενεργήθηκε η διαδικασία του ανοσοφθορισμού. Η ιστοπαθολογική διάγνωση πραγματοποιήθηκε από εξειδικευμένη παθολογοανατόμο, και συμπεριλαμβάνεται επιπλέον ο έλεγχος των συνολικά σπειραμάτων, ποσοστό σφαιρικά σκληρυσμένων σπειραμάτων, τμηματική σκλήρυνση, μηνοειδείς σχηματισμοί (κυτταρικοί, ινοκυτταρικοί, ινώδεις), έκπτυξη της μεσάγγειας ουσίας και υπερκυτταροβρίθεια, ενδοτριχοειδής υπερκυτταροβρίθεια, φλεγμονώδης διήθηση στο διάμεσο χώρο (0:απούσα, 1:μέτρια, 2:σοβαρή), σωληναριακή βλάβη και σωληνίτιδα. Το ποσοστό της διάμεσης ίνωσης και σωληναριακής ατροφίας ποσοτικοποιήθηκαν στο νεφρικό φλοιό, με βάση την ταξινόμηση Banff: απύσα ( $\leq 5$ ), ήπια (6-25%), μέτρια (26-50%), σοβαρή ( $>50\%$ ), και απύσα (0%), ήπια ( $\leq 25\%$ ), μέτρια (26-50%), σοβαρή ( $>50\%$ ), αντίστοιχα.

## **5.2. Τεχνική Ανοσοϊστοχημείας**

Εφαρμόστηκε τυπική διαδικασία ανοσοϊστοχημείας σε δύο ημέρες (επώαση over night). Η μακρότερη επώαση των τομών έχει βασικό πλεονέκτημα τη μεγαλύτερη αραίωση των αντισωμάτων και το μικρότερο κόστος της μεθόδου. Για την ανίχνευση των υπό έλεγχο αντιγόνων χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης πάχους 2-3μm και αντισώματα διαθέσιμα στο εμπόριο. Ακολουθήθηκαν γενικά τα πρωτόκολλα των κασκευαστριών εταιρειών, με μικρές τροποποιήσεις στο εργαστήριο μετά από δοκιμές σε ιστούς-μάρτυρες με θετική έκφραση, προκειμένου να επιτύχουμε αξιόπιστα και ειδικά ευρήματα. Οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, και αφορούν τα εξής στάδια:

### **1<sup>η</sup> ημέρα**

- Η αποπαραφίνωση, η ενυδάτωση και η αποκάλυψη των αντιγονικών επίτοπων πραγματοποιήθηκαν με βρασμό των πλακιδίων σε αυτόματο μηχάνημα (PT Link, της εταιρείας Dako). Ο βρασμός έγινε για 20 min στους 96<sup>0</sup> C, σε υψηλό pH (pH 9) και για τους τρεις υπό μελέτη δείκτες [EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH (50x), Dako]. Η πλήρης αποπαραφίνωση των τομών είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος.
- Έκπλυση με ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH=7) 2 φορές επί 5 min και στέγνωμα των αντικειμενοφόρων πλακών με πετσέτα χάρτου.
- Επώαση των τομών σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 3% για 15 min σε σκοτεινό περιβάλλον. Το τελικό διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση λόγω της ταχείας αποσύνθεσης. Το στάδιο αυτό έχει σαν στόχο την απενεργοποίηση των ενδογενών υπεροξειδασών των ιστικών δειγμάτων, ώστε να αποφευχθεί μία μη ειδική αντίδραση.
- Έκπλυση των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα PBS 2 φορές επί 5 min.
- Στέγνωμα των πλακών με πετσέτα χάρτου γύρω από την τομή κάθε αντικειμενοφόρου πλάκας.
- Αραίωση των πλακών με πετσέτα χάρτου γύρω από την τομή κάθε αντικειμενοφόρου πλάκας.
- Επώαση των πειραματικών (test) ιστικών δειγμάτων με το πρωτογενές αντίσωμα (primary antibody). Χρησιμοποιήθηκαν το πολύ 80 ml αντισώματος για κάθε τομή, και δόθηκε έμφαση να καλύπτεται ολόκληρη η τομή και να βρίσκεται σε οριζόντια θέση προκειμένου

να μη μετατοπισθεί το διάλυμα και μείνει ακάλυπτο τμήμα της τομής. Τα ιστικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (negative controls), επώαστηκαν με PBS (pH=7), χωρίς προσθήκη πρωτογενούς αντισώματος. Σαν θετικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν τομές με γνωστή έκφραση των υπό εξέταση αντιγόνων και συγκεκριμένα ως εξής:

- Τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών σε υγρό κλειστό δοχείο και παραμονή του δοχείου στους 4 βαθμούς κελσίου (στο ψυγείο) προκειμένου να επωασθούν με το πρωτογενές αντίσωμα καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας.

## 2<sup>η</sup> ημέρα

- Έκπλυση των τομών με PBS 2 φορές επί 5 min.
- Επώαση όλων των ιστικών δειγμάτων, τόσο των πειραματικών (tests), όσο και των αρνητικών μαρτύρων (negative controls), με το δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody) για 30 min.
- Έκπλυση των τομών με PBS 2 φορές επί 5 min.
- Επώαση των τομών με πολυμερές, συζευγμένο με HRP (horseradish peroxidase), το οποίο αναγνωρίζει το σύμπλοκο πρωτογενούς – δευτερογενούς αντισώματος, για 30 min.
- Έκπλυση των τομών με PBS 2 φορές επί 5 min.
- Επώαση των τομών με τη χρωμογόνο ουσία διαμινο-βενζιδίνη (DAB) για 6 min σε σκοτεινό περιβάλλον, με σκοπό την πραγματοποίηση αντίδρασης μεταξύ των συστατικών DAB-HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ο πολυμερισμός της DAB παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αποδίδει καφέ χρώση που ελέγχεται και αξιολογείται στο οπτικό μικροσκόπιο.
- Εμβάπτιση των τομών σε αιματοξυλίνη για 30 sec προκειμένου να βαφτούν οι πυρήνες των κυττάρων ώστε να απεικονισθεί αδρά ο ιστός (counterstaining).
- Αφυδάτωση των τομών με αντίστροφη εμβύθιση σε αιθανόλη διαδοχικά πυκνότερη ως εξής
  - 70% αιθανόλη (5min)
  - 90% αιθανόλη (5min)
  - 100% αιθανόλη (2φορές επί 5 min)
  - Ξυλόλη (2 φορές επί 5 min)

- Τοποθέτηση 1-2 σταγόνων βαλσάμου του Καναδά (DPX) σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα ώστε να επιτευχθεί η προσκόλληση της καλυπτρίδας σε κάθε πλάκα, καθιστώντας την έτοιμη προς μικροσκόπηση.

### **5.3 Αντισώματα**

#### **Πρωτογενή μονοκλωνικά αντισώματα**

1. Anti-Smad7 (Z8-B) (Santa Cruz Biotechnology, USA), σε αραίωση 1:300
2. anti-pSmad3 (1D9) (Santa Cruz Biotechnology, USA), σε αραίωση 1:100
3. anti-TGF- $\beta$ 1 (3C11) (Santa Cruz Biotechnology, USA), σε αραίωση 1:50

Το σύστημα προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν το UltraVision Quanto Detection System, HRP Quanto & DAB Quanto, της εταιρείας Thermo Scientific, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

#### **Δευτερογενή αντισώματα**

Το δευτερογενές αντίσωμα ήταν συνδεδεμένο με ένζυμο, την υπεροξειδάση του ραπανακίου (horseradish peroxidase, HRP) (εμπορικός κωδικός K5007, ChemMate, Dako Envision). Το αντίσωμα αυτό παρέχεται έτοιμο προς χρήση και επομένως δεν απαιτείται η αραίωση του με ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα.



## **5.4 Εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης**

### **Ημιποσοτική Μέθοδος**

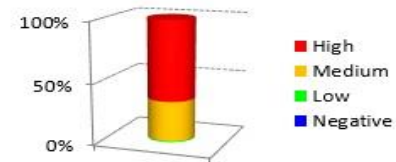
Η ανοσοϊστοχημική έκφραση (πυρηνική για Smad7 και pSmad3 και κυτταροπλασματική για TGF-β1) αξιολογήθηκε ξεχωριστά σε κάθε σπείραμα (μεσαγγειακά, ενδοθηλιακά και/ή επιθηλιακά κύτταρα), διάμεσο ιστό, διάμεση φλεγμονή και σωληναριακά κύτταρα. Επιπλέον, ερευνήσαμε την έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες ιστολογικές βλάβες (μεσαγγειακή υπερκυτταροβρίθεια, ενδοτριχοειδική υπερκυτταροβρίθεια, μηννοειδείς σχηματισμοί, τμηματική σκλήρυνση και πάχυνση της βωμανείου κάψας). Η αξιολόγηση της έντασης των TGF-β1, pSmad3 και Smad7 μετρήθηκε με βάση την ακόλουθη κλίμακα 0-3: 0: χωρίς ένταση, 1: ήπια ένταση, 2: μέτρια ένταση, 3: έντονη ένταση.

## 5.5 Ψηφιακή Μέθοδος Ανάλυσης και Επεξεργασίας Εικόνας (Image Analysis)

### Ποσοτική Μέθοδος

Για την ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των TGF-β1, pSmad3 and Smad7 χρησιμοποιήθηκε ψηφιακό πρόγραμμα ανάλυσης και επεξεργασίας εικόνας χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Image Pro Plus5.1 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Σε κάθε ιστολογική τομή, 7-10 περιοχές επιλέχθηκαν (Hot Spots) και αποθηκεύτηκαν ως φωτογραφίες (Analog SC30 Olympus Camera), χρησιμοποιώντας μεγέθυνση x 400 (BX43 3-Ophthalmic Microscope). Η χρώση αναδείχθηκε ως καφέ διαμινοβενζιδίνης (DAB), η οποία θεωρείται θετική, ενώ η χρώση κυανού της αιματοξυλίνης θεωρήθηκε αρνητική. Η μέση ένταση της καφέ χρώσης [μετρούμενη σε γραμμική κλίμακα από το 0 (υψηλότερη ένταση) μέχρι το 255 (μη ανιχνεύσιμη)] και η μέση έκταση της καφέ χρώσης αξιολογήθηκαν ταυτόχρονα για κάθε τομή. Χρησιμοποιήσαμε το δείκτη ενεργότητας (HScore) [δείκτης ενεργότητας= (%Negative X 0) + (%Low X 1) + (%Medium X 2) + (%High X 3)] ως αριθμητική παρουσίαση της έντασης και κατανομής στο δείγμα και η ένταση χαρακτηρίστηκε ως ήπια (0-1), μέτρια (1-2) και έντονη (2-3).

Density (ave)	84,455	15,263	81,608			
Density (std)	23,221	5,238	21,892			
<b>Item Calculations</b>						
	<b>Ratios</b>			<b>Ratios</b>		
PERarea (%)	8,1%	Ratio of Total Objects Area to Total Regions Area (percentage)				
OBJnum (1mm)	47631	Calculated Objects Number for a Region Area (equal to 1x1mm)				
<b>Cells Percent Activity</b>						
<b>Cells Counting</b>		<b>Positive</b>	<b>Negative</b>	<b>Total</b>		
Objects (%)		948 100,0%	0 0,0%	948		
<b>Positive Classes</b>		<b>Low</b>	<b>Medium</b>	<b>High</b>		
Objects (%)		9 0,9%	313 33,0%	626 66,0%		
<b>Activity Index</b>		<b>2,65</b>	HSCORE			
<b>Activity Index = ( %Negative X 0 ) + ( %Low X 1 ) + ( %Medium X 2 ) + ( %High X 3 )</b> Activity Indices are a numerical representation of staining intensity and distribution in the specimen. 0 - 1 = Homogenous and/or heterogenous low staining activity/intensity. 1 - 2 = Homogenous and/or heterogenous medium staining activity/intensity. 2 - 3 = Relatively heterogenous high staining activity/intensity.						



Εικόνα 18. Στιγμιότυπο από Image Pro Plus5.1 software

## **5.6 Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων**

Οι κατηγορικές μεταβλητές περιγράφηκαν μέσω σχετικών και απόλυτων συχνοτήτων, ενώ για τις συνεχείς μεταβλητές παρουσιάστηκαν είτε ο μέσος με την τυπική απόκλιση είτε η διάμεσος με το εύρος. Η αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ κατηγορικών μεταβλητών βασίστηκε στη στατιστική δοκιμασία Chi-Square test ή στο Fisher's exact test όταν ο Χι τετράγωνο έλεγχος δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί. Για τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ κατηγορικών και συνεχών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το T-test ανεξάρτητων δειγμάτων. Η ανάλυση του χρόνου ως εξέλιξη στη χρόνια νεφρική νόσο (XNN), χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου (XNNTΣ) και υποτροπής βασίστηκε σε τεχνικές ανάλυσης επιβίωσης. Πολυπαραγοντική ανάλυση με την βοήθεια Cox μοντέλου έγινε μόνο στην περίπτωση της ανάλυσης της εξέλιξης στη XNN. Η ένταση στο σπείραμα αναλύθηκε κυρίως σαν κατηγορική μεταβλητή, για την σύγκριση όμως μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ασθενών και λόγω του μικρού μεγέθους δείγματος, η ένταση στο σπείραμα χρησιμοποιήθηκε σαν συνεχής. Η στατιστική ανάλυση έγινε στο STATA V15.1 όλοι οι έλεγχοι ήταν αμφίπλευροι και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε  $p \leq 0.05$ .

## 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 7.1 Κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία

Πενήντα ασθενείς συμπεριλήφθηκαν, με 6 διαφορετικές κατηγορίες ΣΝ (1. IgA νεφροπάθεια, 2. ANCA-σχετιζόμενη ΣΝ, 3. ΣΝ σχετιζόμενη με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο, 4. Μembranώδη Νεφροπάθεια, 5. Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση 6. Νόσος Ελαχίστων Αλλοιώσεων). Σε όλο το σύνολο των ασθενών καταγράφηκε μέση ηλικία κατά τη διάγνωση  $54.95 \pm 18.4$  έτη και το 54% ήταν άνδρες και όλοι Καυκάσιοι. Η μέση τιμή κρεατινίνης ορού και πρωτεϊνουρίας κατά τη διάγνωση ήταν  $2.23 \pm 2.44$  mg/dL και  $7.46 \pm 7.05$  g/24ώρο, αντίστοιχα. Επιπλέον, κατά τη διάγνωση τα τρία τέταρτα των ασθενών (66%) παρουσίαζε μικροσκοπική αιματουρία και περίπου οι μισοί ασθενείς (56%) υπέρταση.

Οι ασθενείς είχαν διάμεσο χρόνο παρακολούθησης 51 μήνες (εύρος 18-75 μήνες). Στο τέλος του χρόνου παρακολούθησης, 22 ασθενείς (44%) παρουσίασαν εξέλιξη της ΧΝΝ, ενώ 5 ασθενείς (10%) ΧΝΝΤΣ. Επιπλέον, καταγράφηκε σε 12 ασθενείς (24%) τουλάχιστον ένα επεισόδιο υποτροπής. (Πίνακας 1)

## Πίνακας 1. Δημογραφικά και Κλινικά χαρακτηριστικά

Χαρακτηριστικά	Ασθενείς αριθμός=50
Ηλικία (έτη), μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση	54.95 $\pm$ 18.47
Φύλο (θήλυ), αριθμός (%)	23 (46%)
Τιμή κρεατινίνης ορού στη διάγνωση (mg/dL), μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση	2.23 $\pm$ 2.44
eGFR στη διάγνωση (ml/min/1.73m <sup>2</sup> ) μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση	58 $\pm$ 14.7
Πρωτεϊνουρία στη διάγνωση (γρ/24ώρο), μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση	7.46 $\pm$ 7.09
Σπειραματική αιματουρία, αριθμός (%)	33 (66%)
Αιμοσφαιρίνη κατά τη διάγνωση (g/dL), μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση	12.5 $\pm$ 1.82
Επίπεδα συμπληρώματος 3 ορού κατά τη διάγνωση (mg/dL) μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση	112.6 $\pm$ 38.3
Επίπεδα συμπληρώματος 4 κατά τη διάγνωση (mg/dL) μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση	24.8 $\pm$ 9.73
Υπέρταση κατά τη διάγνωση, αριθμός (%)	28 (56%)
Χρόνος παρακολούθησης (μήνες), μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση	54.95 $\pm$ 18.4
Τιμή κρεατινίνης ορού στο τέλος του χρόνου παρακολούθησης (mg/dL), μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση	1.79 $\pm$ 1.61

eGFR στο τέλος του χρόνου παρακολούθησης (ml/min/1.73m <sup>2</sup> ) μέσος όρος ± τυπική απόκλιση	57.5 ± 31.43
Πρωτεϊνουρία στο τέλος του χρόνου παρακολούθησης (mg/dL), μέσος όρος ± τυπική απόκλιση	1.78 ± 2.65
Ύφεση, αριθμός (%)	
Πλήρη/μερική ύφεση	40 (80%)
Όχι ύφεση	10 (20%)
Υποτροπή, αριθμός (%)	12 (24%)
XNN εξέλιξη, αριθμός (%)	22 (44%)
XNNTΣ, αριθμός (%)	5 (10%)
Θάνατος, αριθμός (%)	4 (8%)

---

XNN, χρόνια νεφρική νόσος, XNNTΣ, χρόνια νεφρική νόσος τελικού σταδίου.

## **7.2 Βιοψία Νεφρού – Ιστολογικά Ευρήματα**

Στο σύνολο των βιοψιών νεφρού τις πιο συχνές ιστολογικές βλάβες αποτελούσαν η μεσαγγειακή υπερκυτταροβρίθεια (62%) και η έκπτυξη της μεσαγγείου ουσίας (38%). Μηνοειδείς σχηματισμοί καταγράφηκαν στο 40% των βιοψιών. Διάμεση φλεγμονή (μέτρια ή έντονη) περιγράφηκε στην πλειονότητα των βιοψιών (78%), ενώ η οξεία σωληναριακή βλάβη στο 26%. Περισσότερο από το 20% των σπειραμάτων ήταν σφαιρικά σκληρυσμένα στο 62% συνολικά των βιοψιών, και πάνω από 25% διάμεση ίνωση παρατηρήθηκε στο 44% στο σύνολο των βιοψιών. (Πίνακας 2)

Η ημιποσοτική ανοσοϊστοχημική ανάλυση των TGF- $\beta$ , pSmad3 και Smad7 εκφράσεων, όπως προαναφέρθηκε, επιβεβαιώθηκε με μέθοδο ψηφιακής ανάλυσης και επεξεργασίας εικόνας (Image Analysis), η οποία αποτελεί μία ποσοτική μέθοδο. Εφόσον επιτεύχθηκε συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων ως προς τα αποτελέσματα της ανάλυσης, στο παρακάτω κείμενο οι εκφράσεις παρουσιάζονται ταυτόχρονα ως προς τις δύο μεθόδους (ποσοτική και ημιποσοτική) και χαρακτηρίζονται ως ήπια, μέτρια και έντονη.

**Πίνακας 2. Ιστολογικά χαρακτηριστικά των βιοψιών νεφρού**

<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>Βιοψίες Αριθμός=50</b>
Συνολικός αριθμός σπειραμάτων, μέσος όρος ± τυπική απόκλιση	11.5 ± 6.16
Σφαιρικά σκληρυσμένα σπειράματα (%), μέσος όρος ± τυπική απόκλιση	19.5 ± 17.5
Τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, μέσος όρος ± τυπική απόκλιση	9.09 ± 11.86
Μηνοειδείς σχηματισμοί, αριθμός (%)	20 (40%)
Μεσαγγειακή υπερπλασία, αριθμός (%)	31 (62%)
Ενδοτριχοειδική υπερπλασία, αριθμός (%)	18 (36%)
Πάχυνση της ΣΒΜ, αριθμός (%)	17 (34%)
Φλεγμονώδης διήθηση του διάμεσου χώρου, αριθμός (%)	
Όχι	11 (22%)
Μέτρια	20 (40%)
Σοβαρή	19 (38%)
Διάμεση ίνωση (%), μέσος όρος ± τυπική απόκλιση	25 ± 13.4
Οξεία Σωληναριακή Βλάβη, αριθμός (%)	13 (26%)
Σωληνίτιδα, αριθμός (%)	4 (8%)
Ινώδης πάχυνση του έσω χιτώνα, αριθμός (%)	42 (84%)
Υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων, αριθμός (%)	4 (8%)

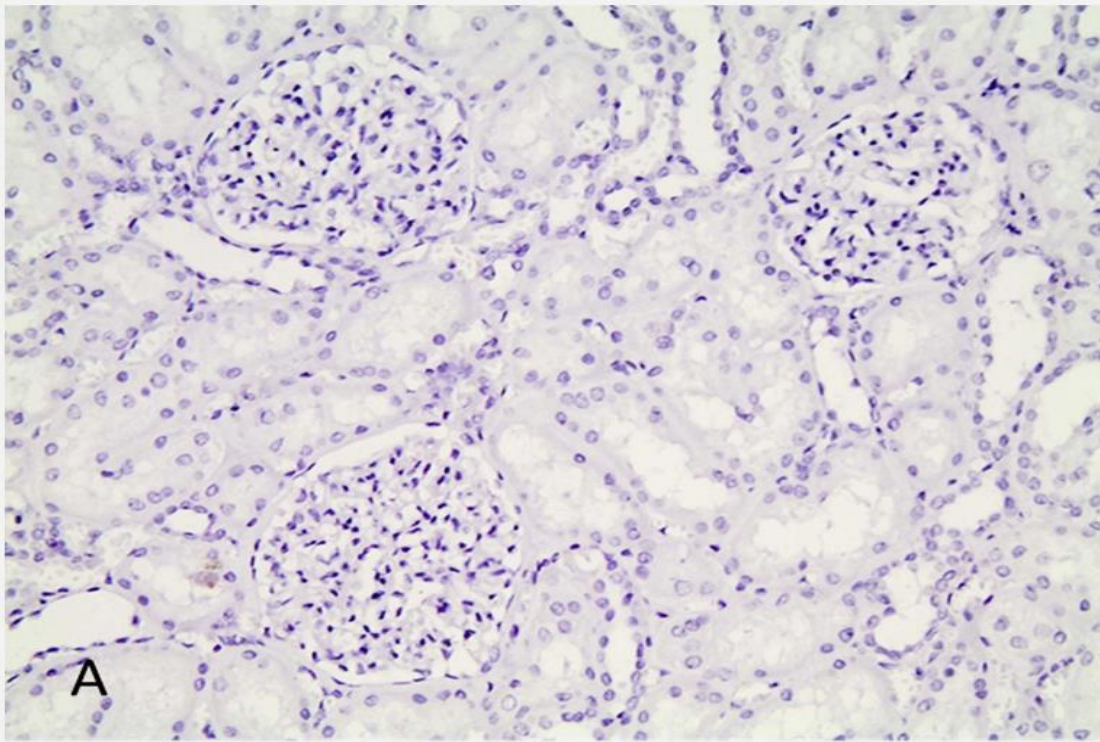
ΣΒΜ, σπειραματική βασική μεμβράνη.



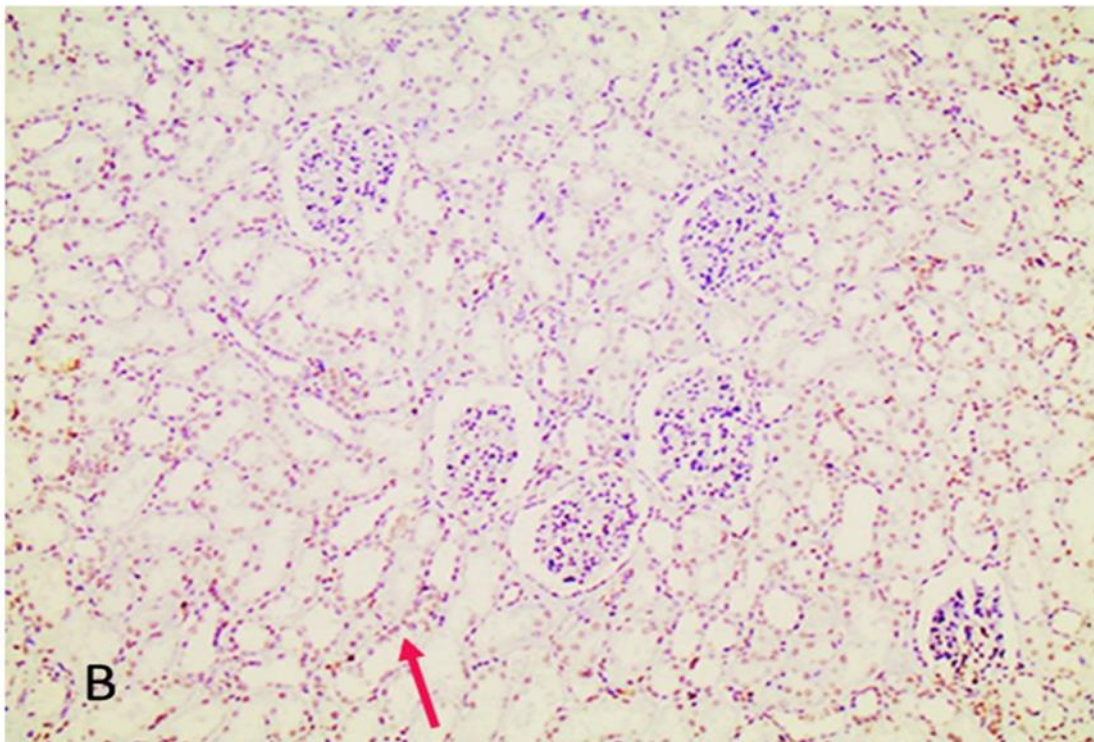
### **7.3 Έκφραση των TGF-β1, pSmad3, Smad7 στο φυσιολογικό νεφρό**

Η αξιολόγηση των υγιών μαρτύρων αποκάλυψε ότι η pSmad3 δεν παρατηρήθηκε σε κανένα είδος κυττάρου (σπείραμα ή/και διαμεσοσωληναριακό χώρο). Η Smad7 εκφράστηκε ασθενώς και εστιακά μόνο στα σωληναριακά κύτταρα. Τέλος, ο TGF-β1 παρατηρήθηκε μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα των περισωληναριακών κυττάρων και στα λεία μυϊκά κύτταρα στις μεσολοβίδιες αρτηρίες. (Εικόνα 18)

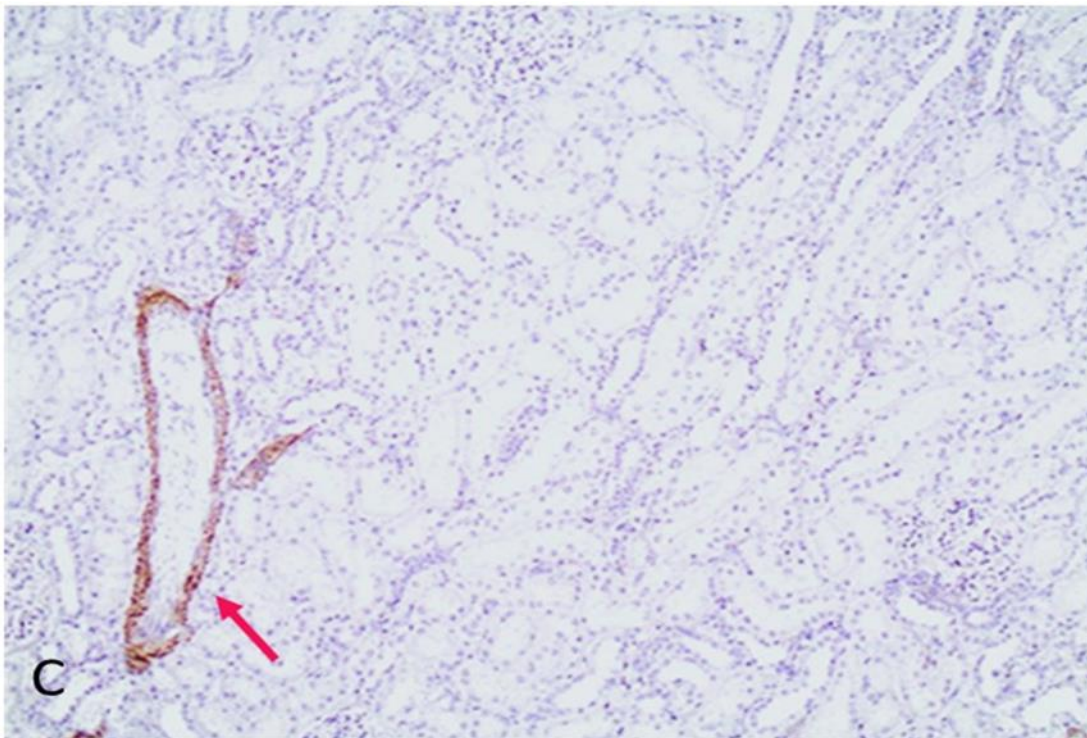
Σε προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπινο ιστό, ο TGF-β1 περιγράφεται σπάνια σε ίχνη μέσα στο σπείραμα καθώς και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Όσον αφορά τη Smad7 και τη Smad3 έχει φανεί να εκφράζονται στα αρχικά στάδια της ανθρώπινης νεφρογένεσης και η έκφραση αυτή μειώνεται καθώς εξελίσσεται η διαφοροποίηση των διαφόρων νεφρικών στοιχείων [263]. Στο νεφρό του ενήλικα ποντικού και του ανθρώπου οι Smad7 και Smad3 εκφράζονται σε μικρό ποσοστό στα τοιχωματικά κύτταρα κυρίως μέσα στο σπείραμα [264], όπως και στο σωληναριακό κύτταρο περισσότερο όμως στο μυελό σε σχέση με το φλοιό, ενώ η pSmad3 δεν έχει περιγραφεί σε υγιείς μάρτυρες.



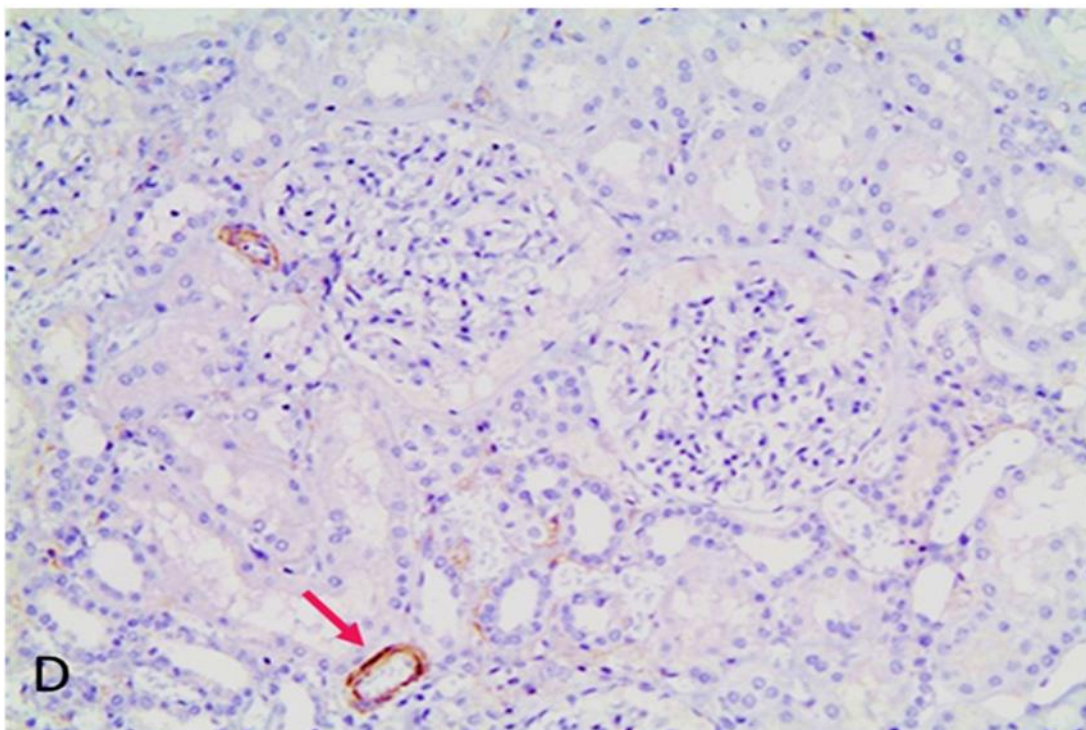
**Εικόνα 18 A.** Υγιής μάρτυρας (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση). pSmad3 αρνητική χρώση (αρχική μεγέθυνση x 200)



**Εικόνα 18 B.** Υγιής μάρτυρας (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση). Smad7 χρώση στα σωληναριακά κύτταρα (αρχική μεγέθυνση x100)



**Εικόνα 18 C.** Υγιής μάρτυρας (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση). C. TGF-β1 χρώση στις μεσολοβίδες αρτηρίες (αρχική μεγέθυνση x100)

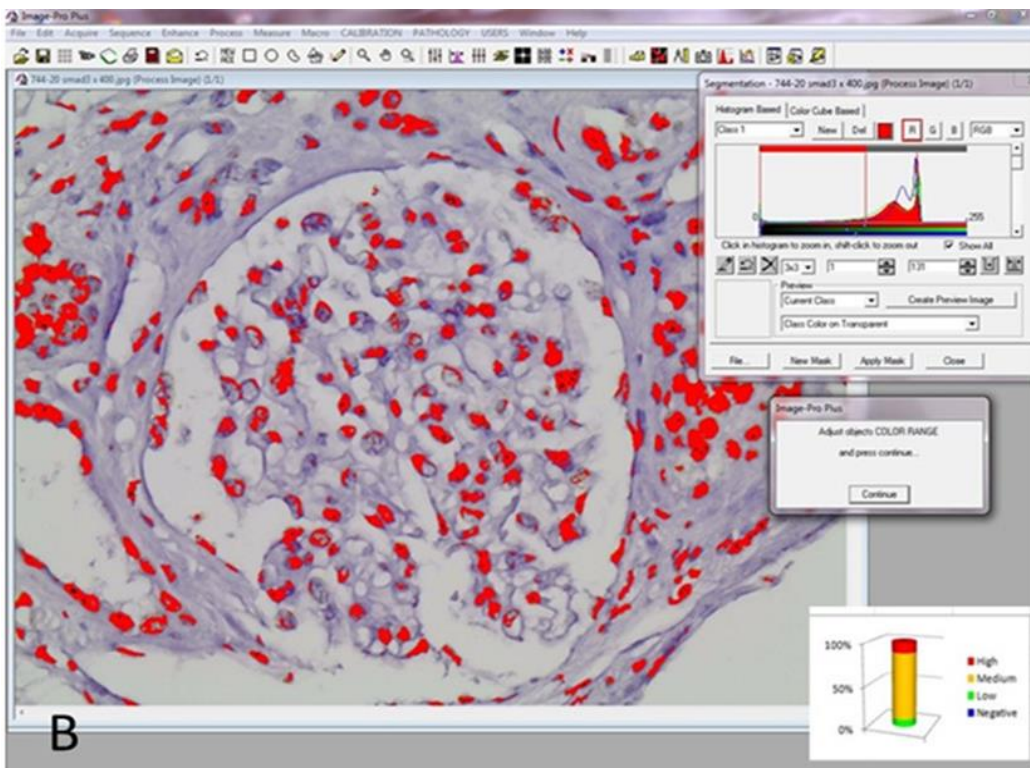
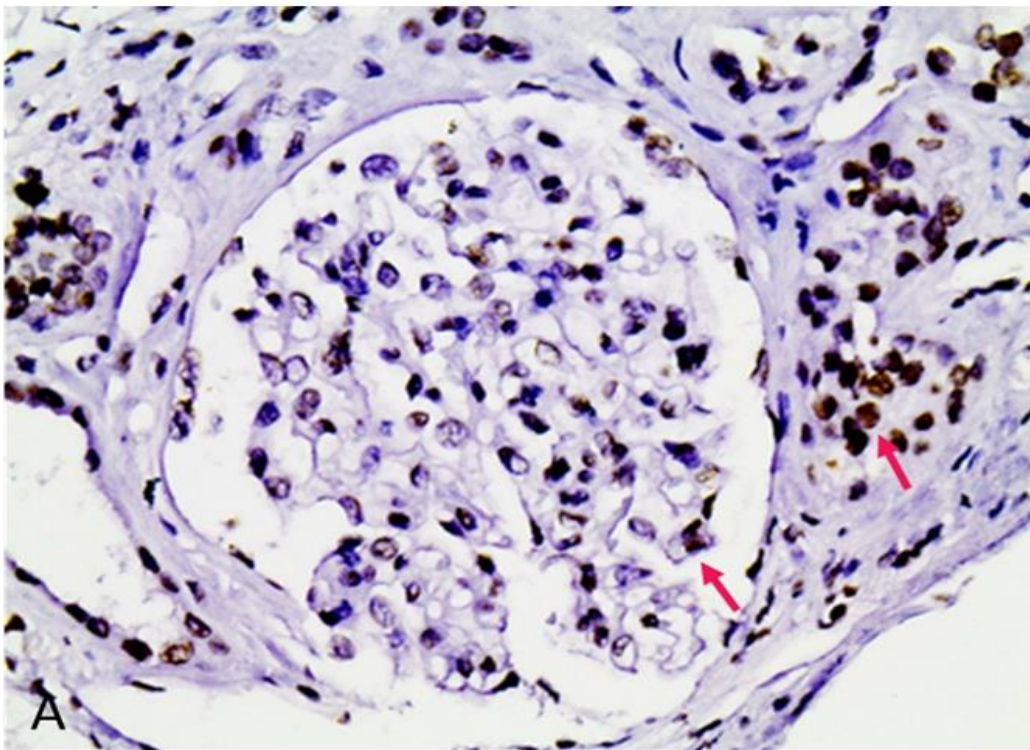


**Εικόνα 18 D.** Υγιής μάρτυρας (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση). D. TGF-β1 χρώση στις μεσολοβίδες αρτηρίες (αρχική μεγέθυνση x200)

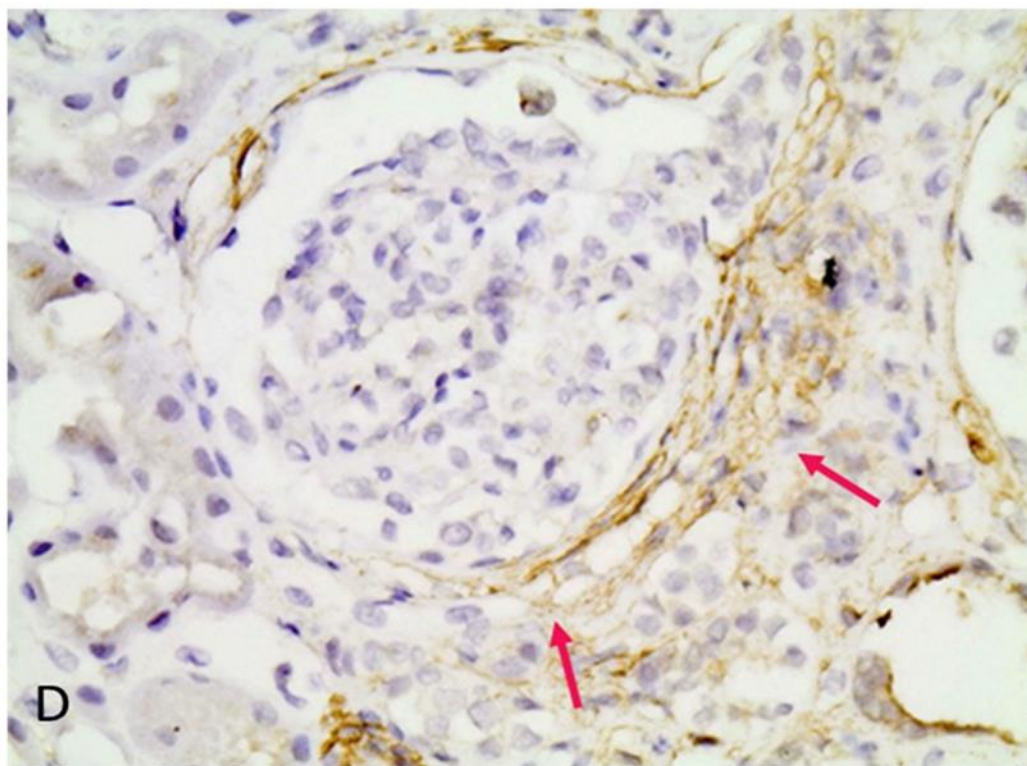
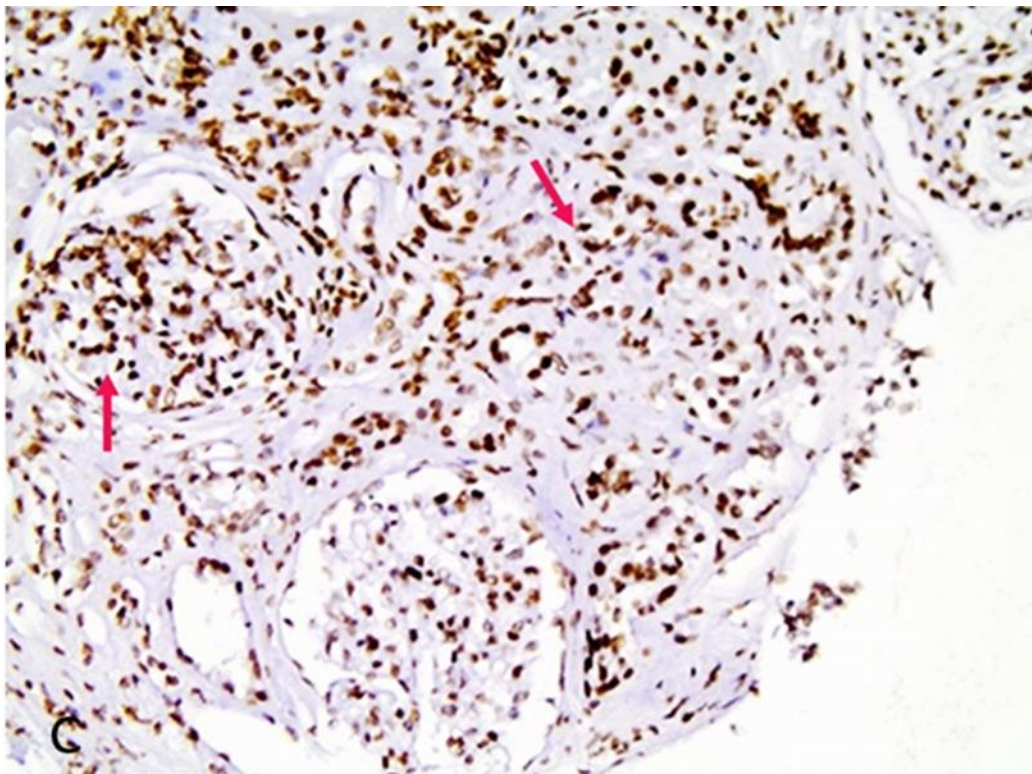
## **7.4 Έκφραση των TGF-β1, pSmad3, Smad7 στις πειραματικές παθήσεις**

### **7.4.1 IgA Νεφροπάθεια**

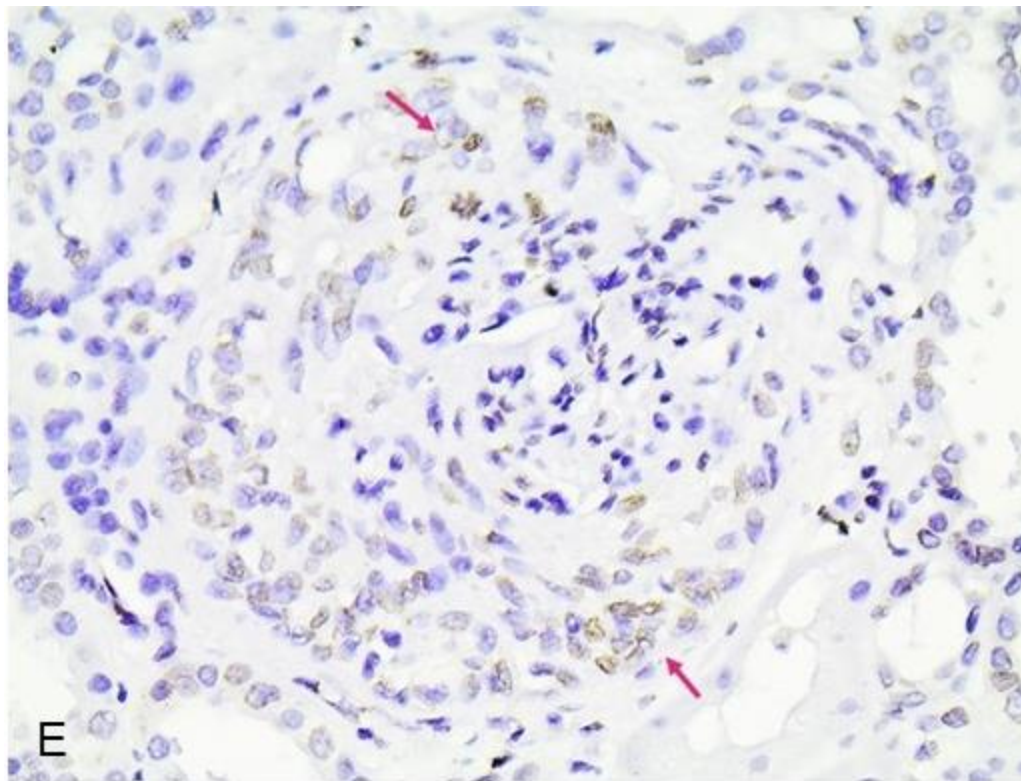
Σε όλα τα πειραματικά κύτταρα, σε μεγαλύτερο βαθμό όμως στα μεσαγγειακά, βρέθηκε να εκφράζονται οι πρωτεΐνες pSmad3 και Smad7. Διάχυτα οι κυτταρικοί μηνοειδείς σχηματισμοί, όπου υπάρχουν, εκφράζουν μέτρια pSmad3 και έντονα Smad7 και να σημειωθεί ότι σε αυτά τα πειράματα η pSmad3 εκφράζεται μόνο στα κύτταρα μέσα στο μηνοειδή σχηματισμό. Η χρώση των pSmad3 και Smad7 είναι πιο έντονη στη διαμεσοσωληναριακή περιοχή, ειδικά στις φλεγμονώδεις διηθήσεις πέριξ της βωμανίου κάψας. Αντίθετα, η έκφραση του TGF-β1 καταγράφηκε ήπια και εστιακή στο σπείραμα, ιδίως σε περιοχές τμηματικής σκλήρυνσης, ενώ στα σωληναριακά κύτταρα και σε περιοχές ίνωσης του διάμεσου υποστρώματος πιο έντονη. (Εικόνα 19)



**Εικόνα 19 A-B.** IgA νεφροπάθεια (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση). A. pSmad3 χρώση στα μεσαγγειακά κύτταρα και στην περιπειραματική φλεγμονώδη διήθηση (αρχική μεγέθυνση x 400). B. Στιγμιότυπο από ψηφιακή ανάλυση εικόνας από το προηγούμενο περιστατικό (A).



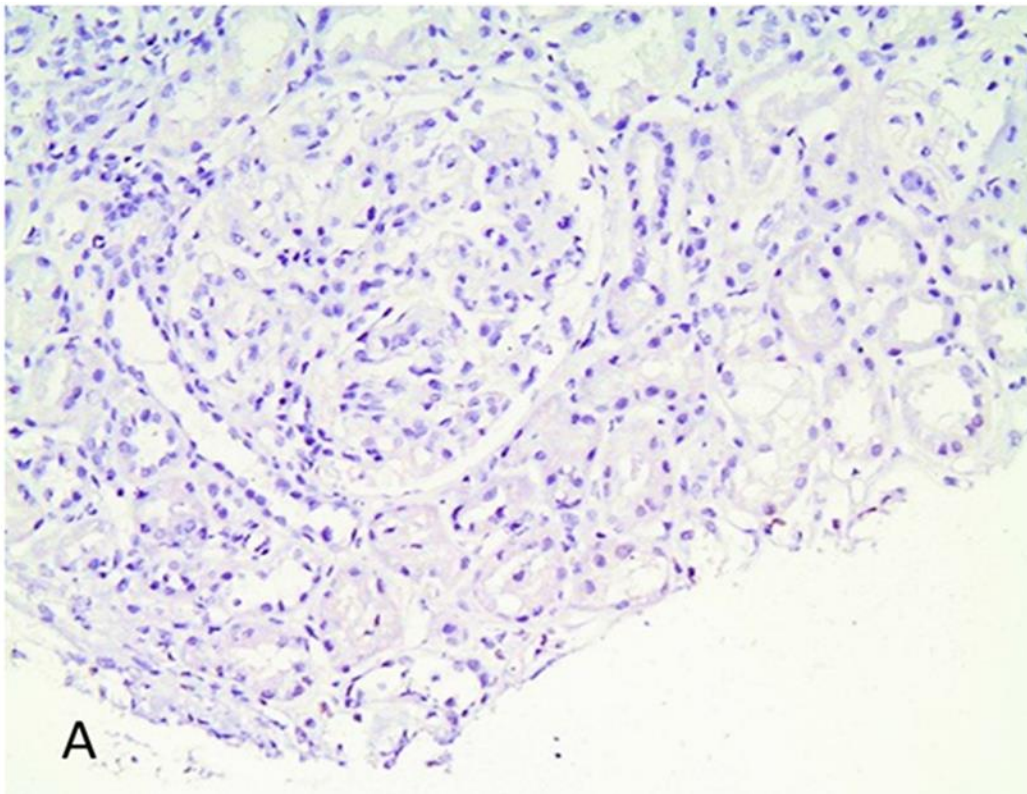
**Εικόνα 19 C-D.** IgA νεφροπάθεια (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση) C. Smad7 χρώση στα σπειραματικά, σωληναριακά και φλεγμονώδη κύτταρα (αρχική μεγέθυνση x200), D. TGF-β1 χρώση στην περισπειραματική ίνωση (αρχική μεγέθυνση x400)



**Εικόνα 19 E.** IgA νεφροπάθεια (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση) E. pSmad3 χρώση μόνο στα κύτταρα μέσα στο μηννοειδή σχηματισμό (αρχική μεγέθυνση x400).

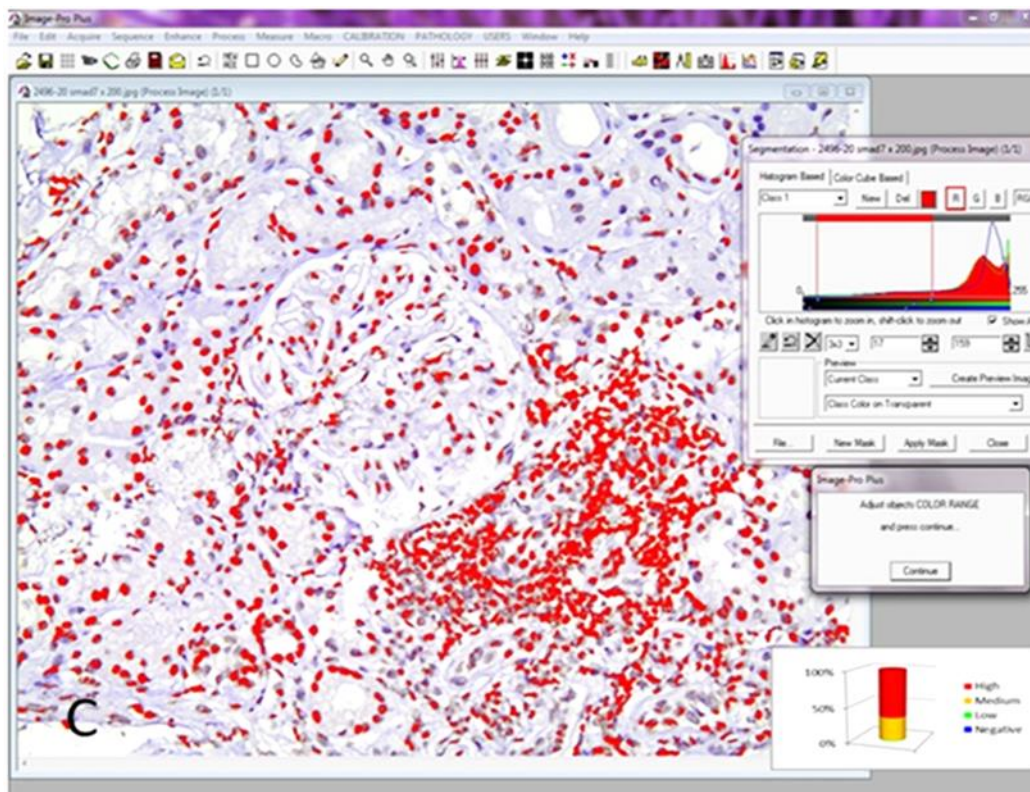
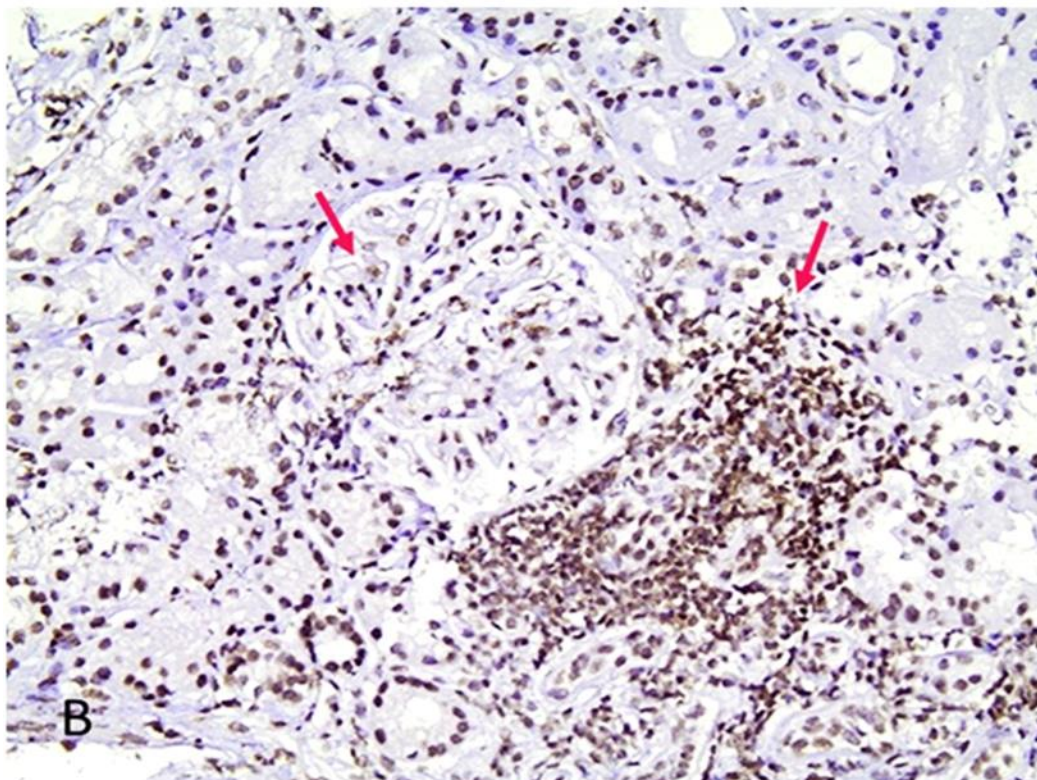
#### 7.4.2. Μembranώδης Σπειραματοπάθεια

Αν και η έκφραση της pSmad3 δε βρέθηκε αυξημένη στο σπειραματικό ή/και σωληναριοδιάμεσο χώρο σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, η ένταση της Smad7 βρισκόταν σε πληθώρα σε όλα τα διαμερίσματα. Περιστασιακά, ο TGF-β1 ήταν παρών στην τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, στην πάχυνση της βωμάνειου κάψας καθώς και στα περισωληναριακά τριχοειδή. (Εικόνα 20)

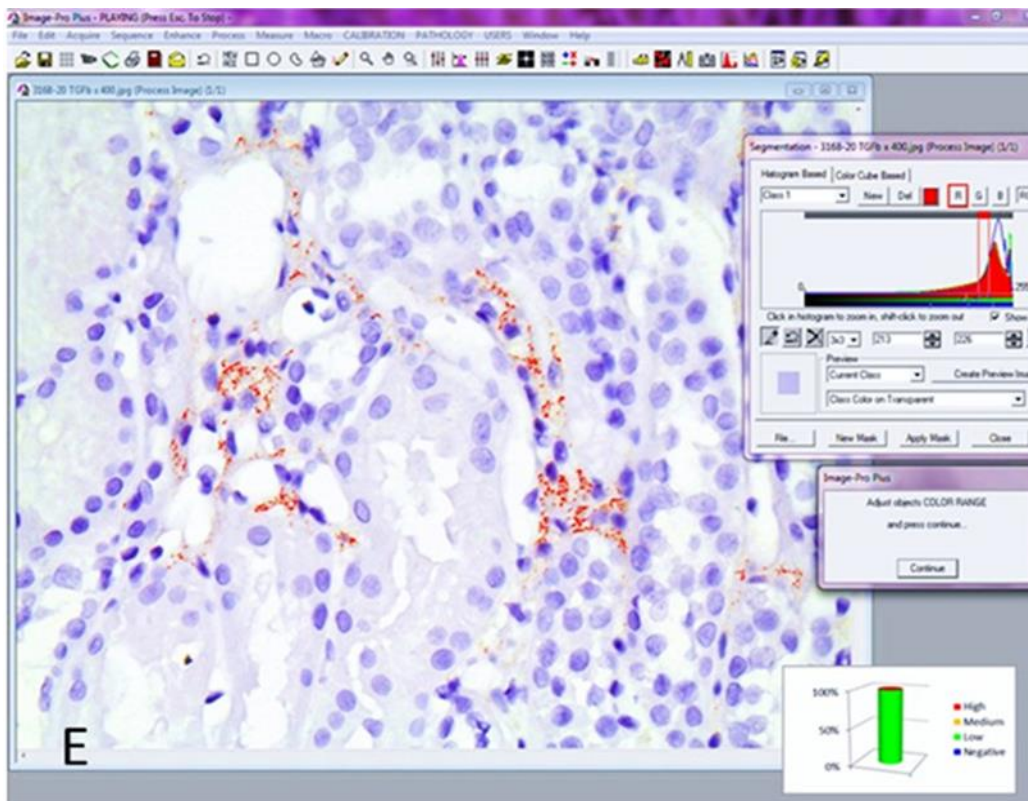
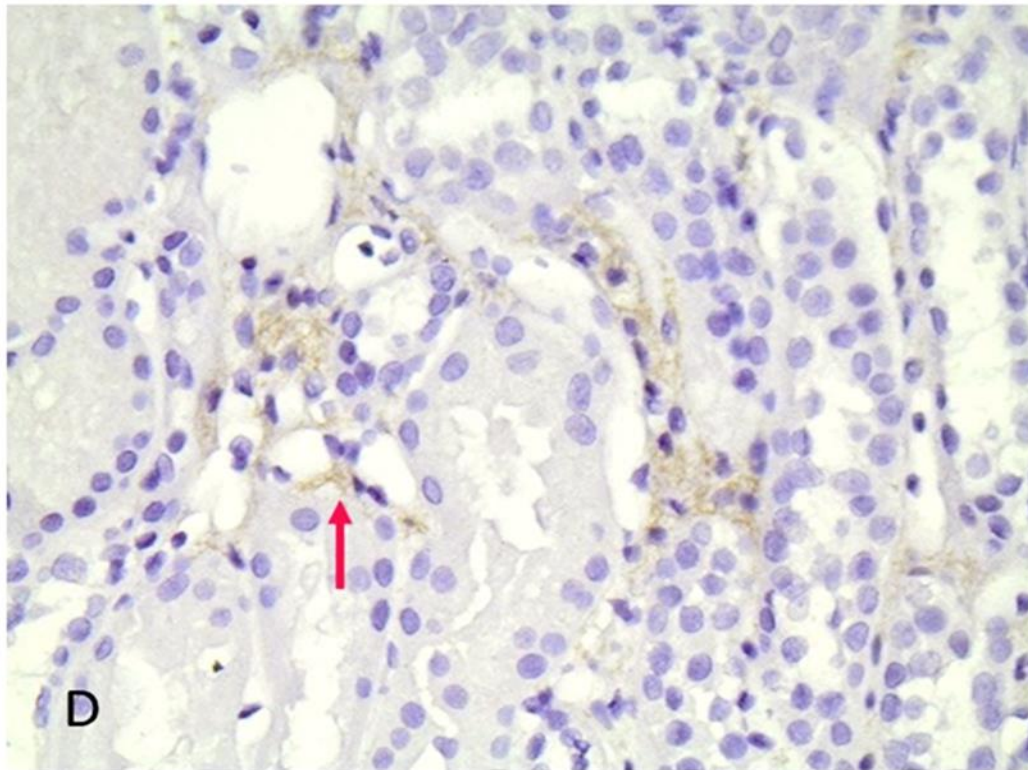


**Εικόνα 20 A.** Μembranώδης σπειραματοπάθεια (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση) A. pSmad3 αρνητική χρώση (αρχική μεγέθυνση x200)

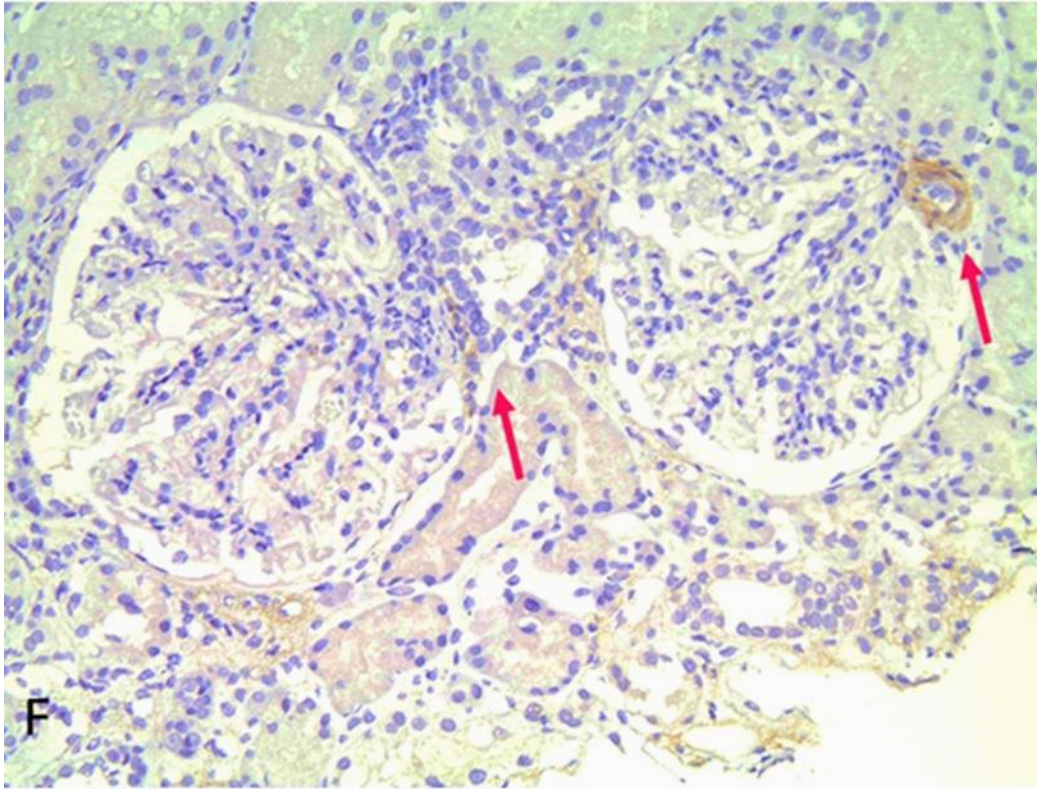




**Εικόνα 20 B-C.** Μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση), B. Smad7 χρώση στα μεσαγγειακά και ποδοκύτταρα, σωληναριακά κύτταρα και φλεγμονώδη κύτταρα του διάμεσου χώρου (αρχική μεγέθυνση x200), C. Στιγμιότυπο από ψηφιακή ανάλυση εικόνας από το προηγούμενο περιστατικό (B)



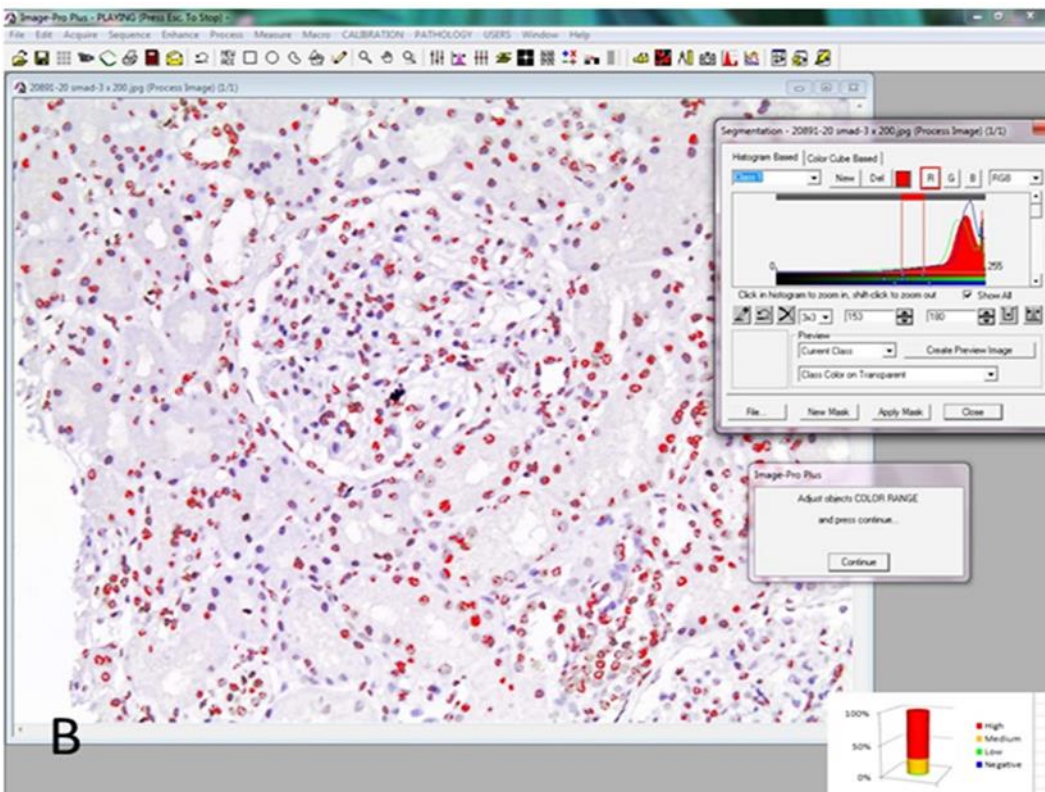
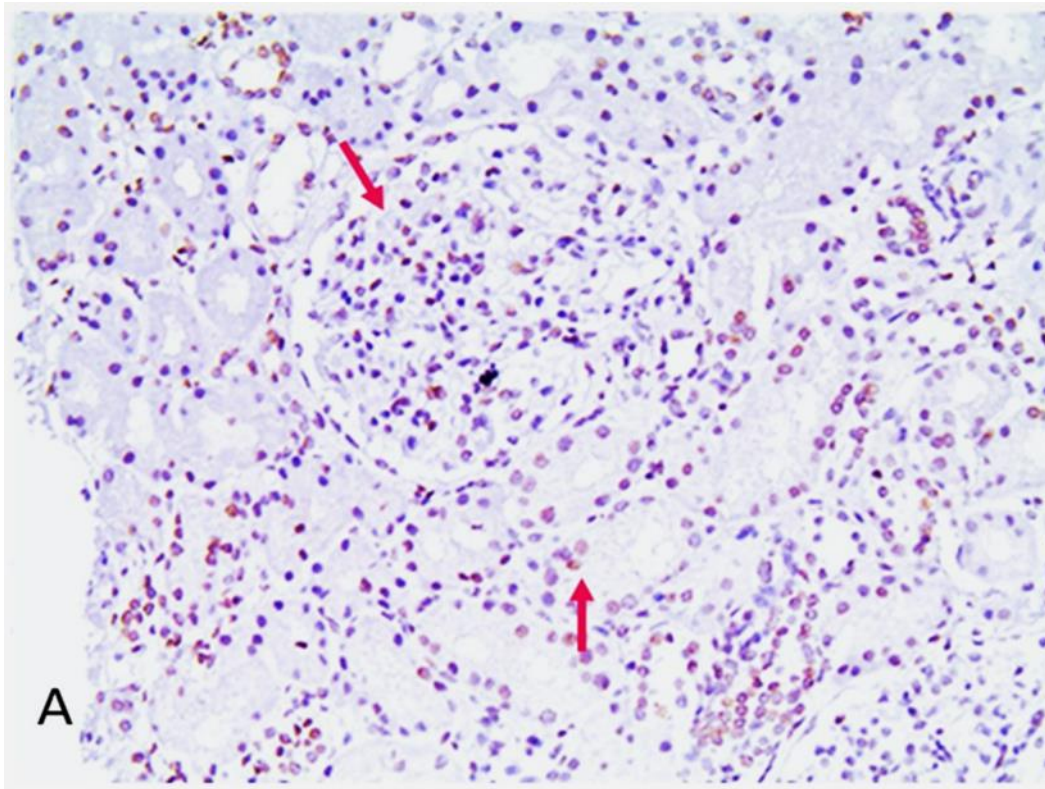
**Εικόνα 20 D-E.** Μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση). D. TGF- $\beta$ 1 χρώση στα περιωληγαριακά τριχοειδή (αρχική μεγέθυνση x400), E. Στιγμιότυπο από ψηφιακή ανάλυση εικόνας από το προηγούμενο περιστατικό (D).



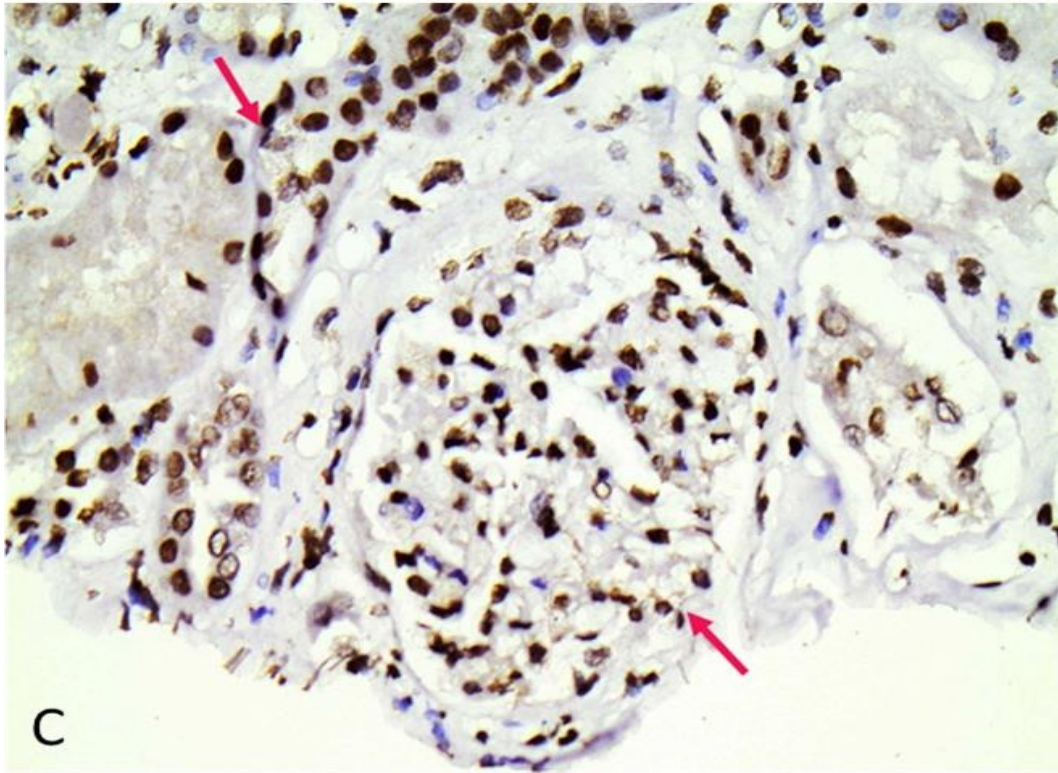
**Εικόνα 20 F.** Μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση) F. TGF-β1 χρώση στη βωμάνειο κάψα (αρχική μεγέθυνση x200).

### **7.4.3. Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση και Νόσος Ελαχίστων Αλλοιώσεων**

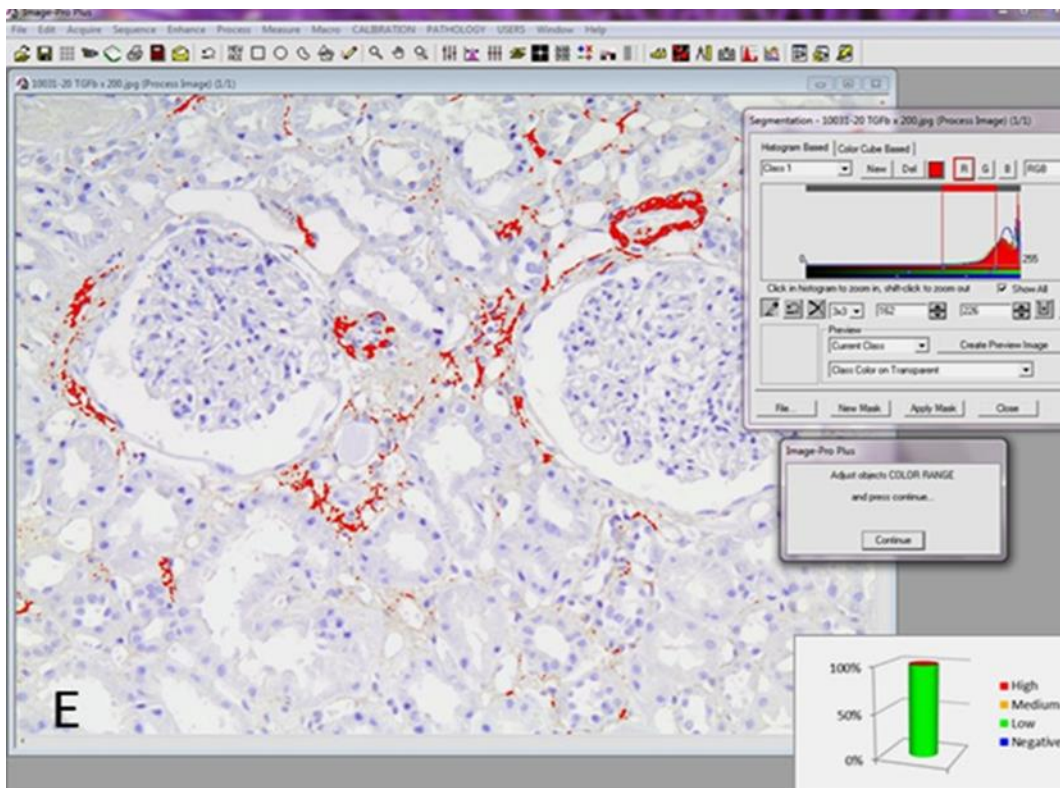
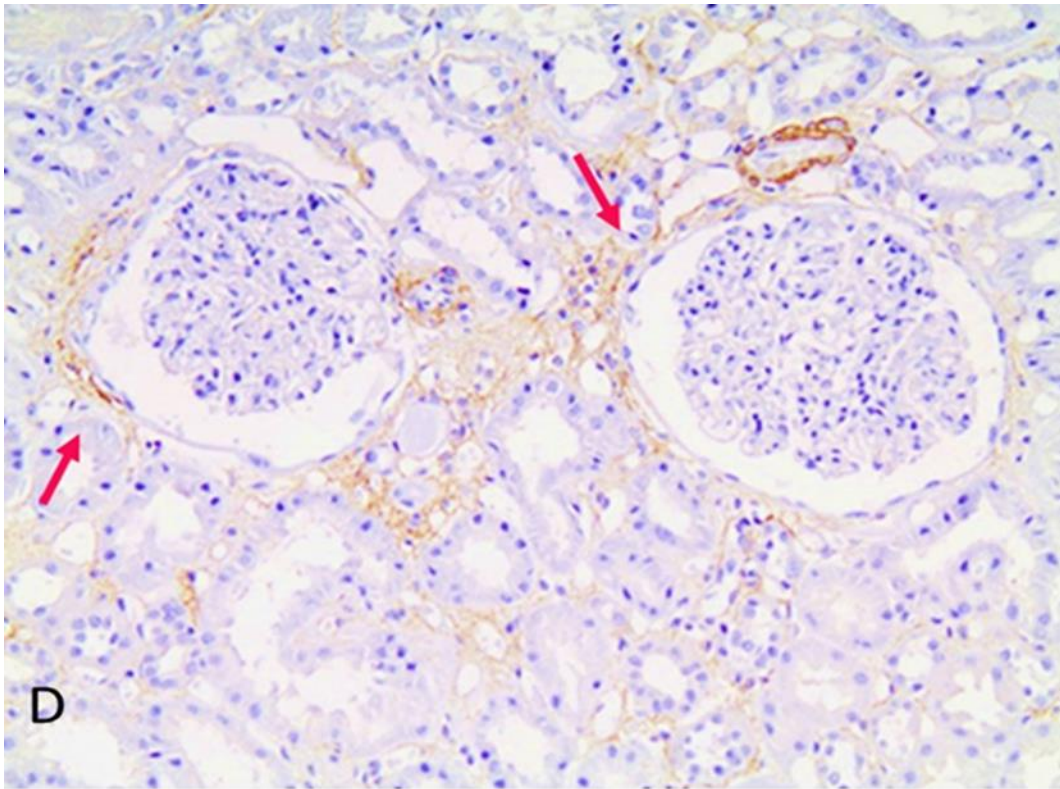
Στην Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση και στη Νόσο Ελαχίστων Αλλοιώσεων η pSmad3 εκφράζεται μέτρια σε όλα τα κύτταρα του σπειράματος, κυρίως όμως στα μεσαγγειακά και στα ποδοκύτταρα, ενώ η Smad7 εκφράζεται έντονα σε όλα τα διαμερίσματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο TGF-β1 παρατηρήθηκε στον περιβωμάνειο χώρο, όχι μόνο όταν η τμηματική σπειραματοσκλήρυνση ήταν παρούσα, αλλά και επίσης εστιακά γύρω από φυσιολογικά σπειράματα. Στη διάμεση ίνωση σημειώνεται μόνο η έκφραση του TGF-β1. (Εικόνα 21)



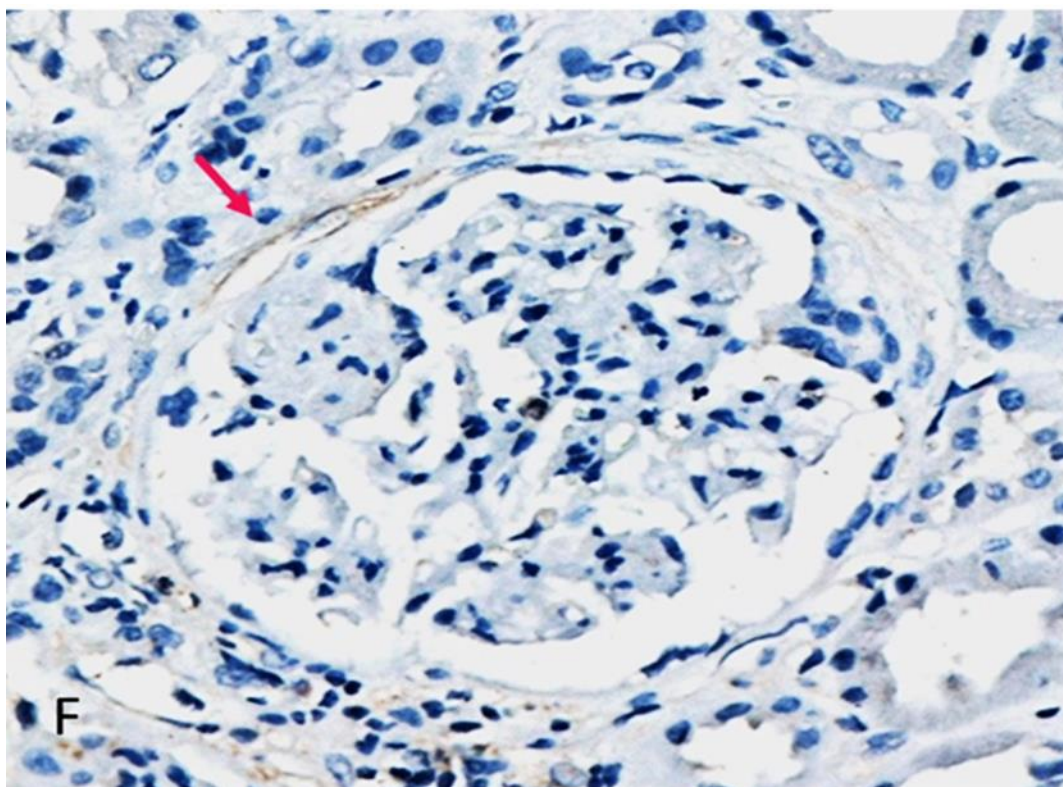
**Εικόνα 21 Α-Β.** Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση). Α. pSmad3 στα μεσαγγειακά κύτταρα (αρχική μεγέθυνση x200), Β. Στιγμιότυπο από ψηφιακή ανάλυση εικόνας από το προηγούμενο περιστατικό (Α).



**Εικόνα 21 C.** Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση). C. Smad7 στα μεσαγγειακά και σωληναριακά κύτταρα (αρχική μεγέθυνση x200)



**Εικόνα 21 D-E.** Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση) D. TGF-β1 χρώση στον περισπειραματικό χώρο (αρχική μεγέθυνση x200) E. Στιγμιότυπο από ψηφιακή ανάλυση εικόνας από το προηγούμενο περιστατικό (D).

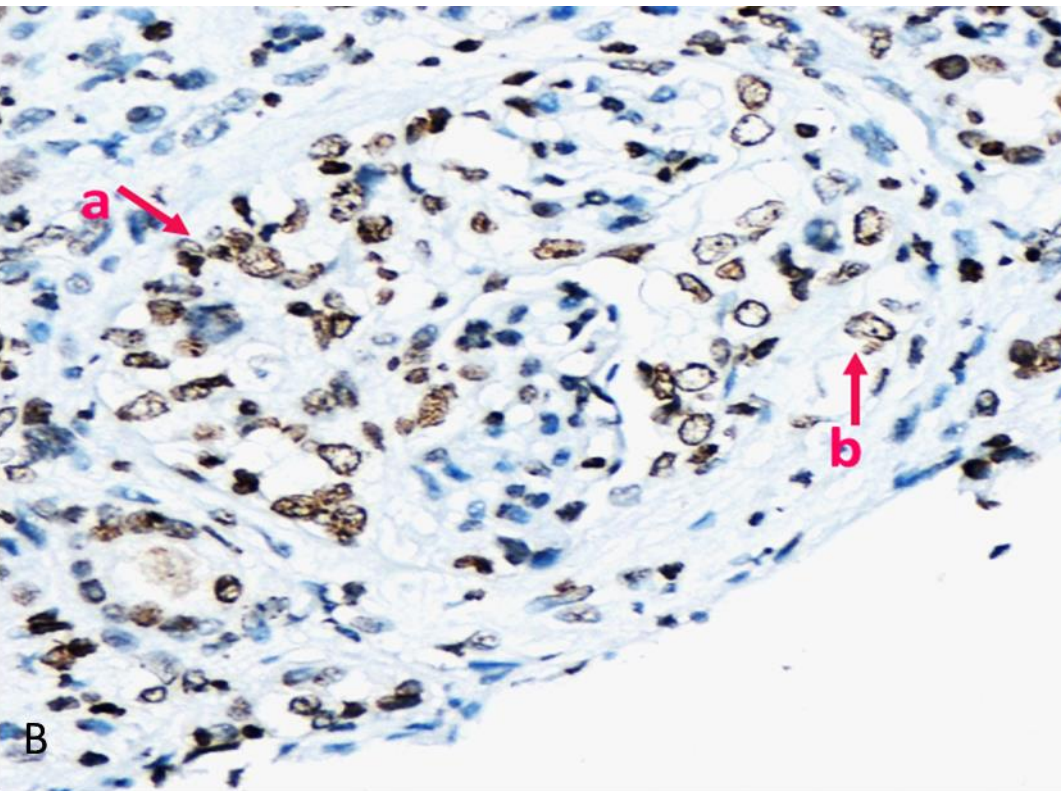
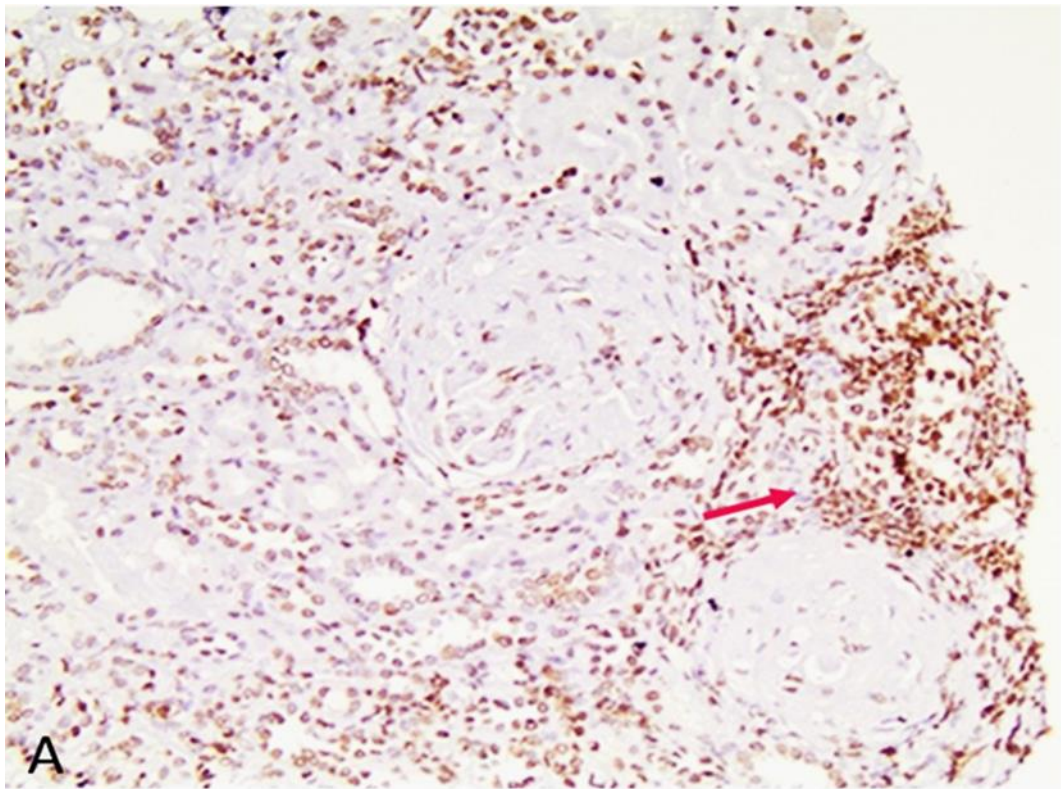


**Εικόνα 21 F.** Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση). F. TGF-β1 χρώση στον περισπειραματικό χώρο γύρω από τμηματική σκλήρυνση (αρχική μεγέθυνση x400)

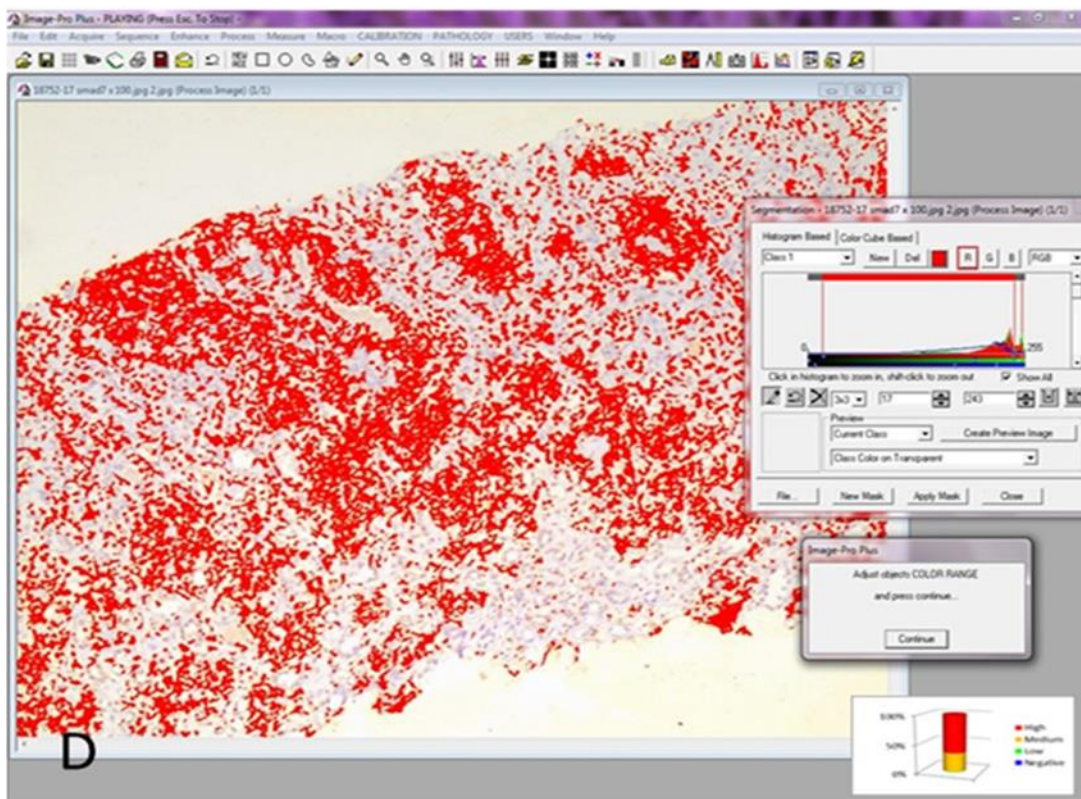
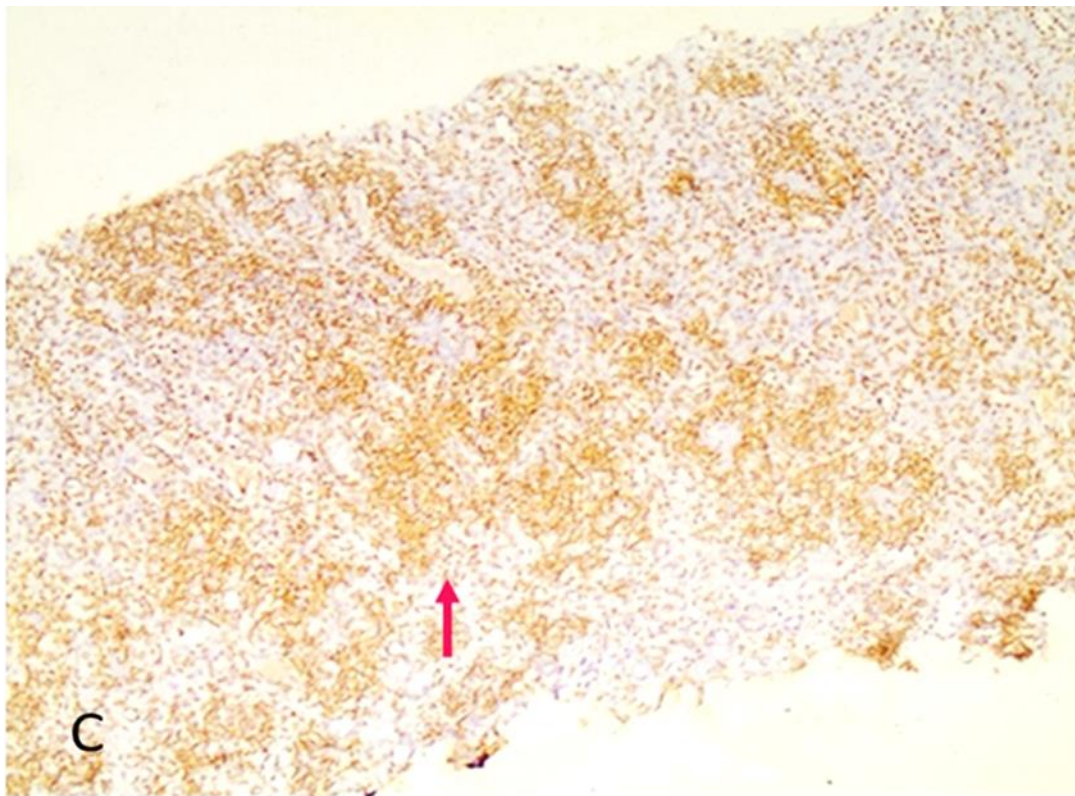


#### 7.4.4. ANCA-σχετιζόμενη σπειραματονεφρίτιδα

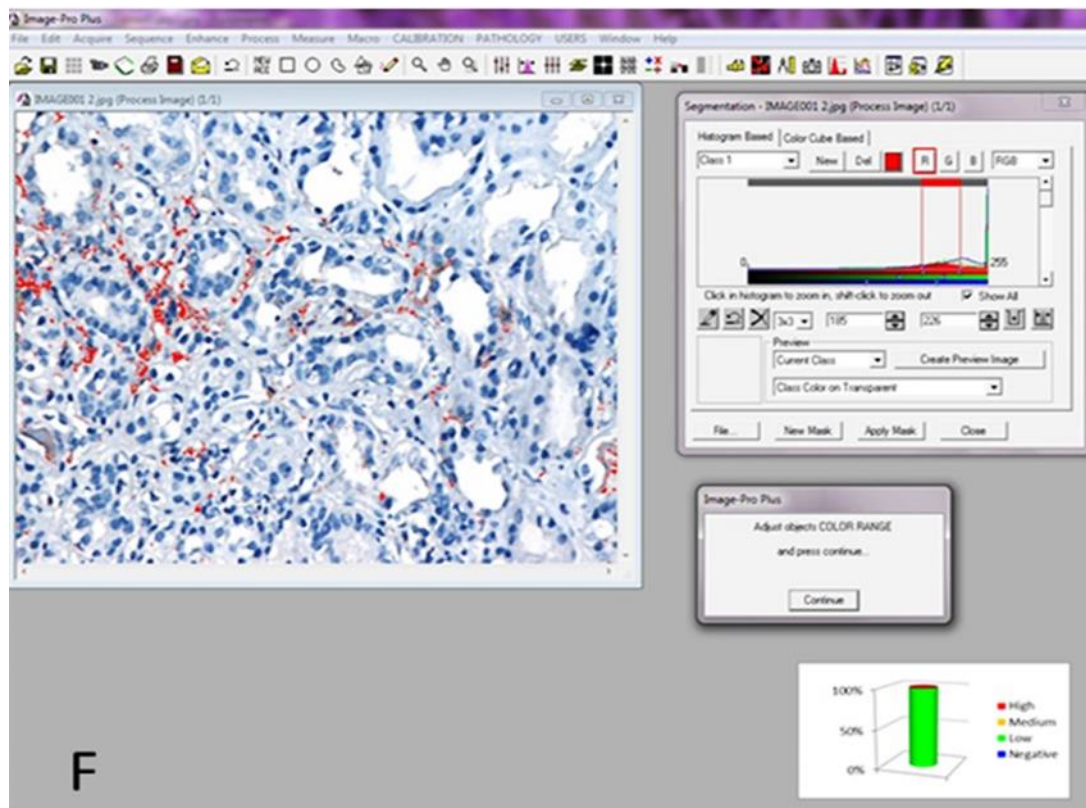
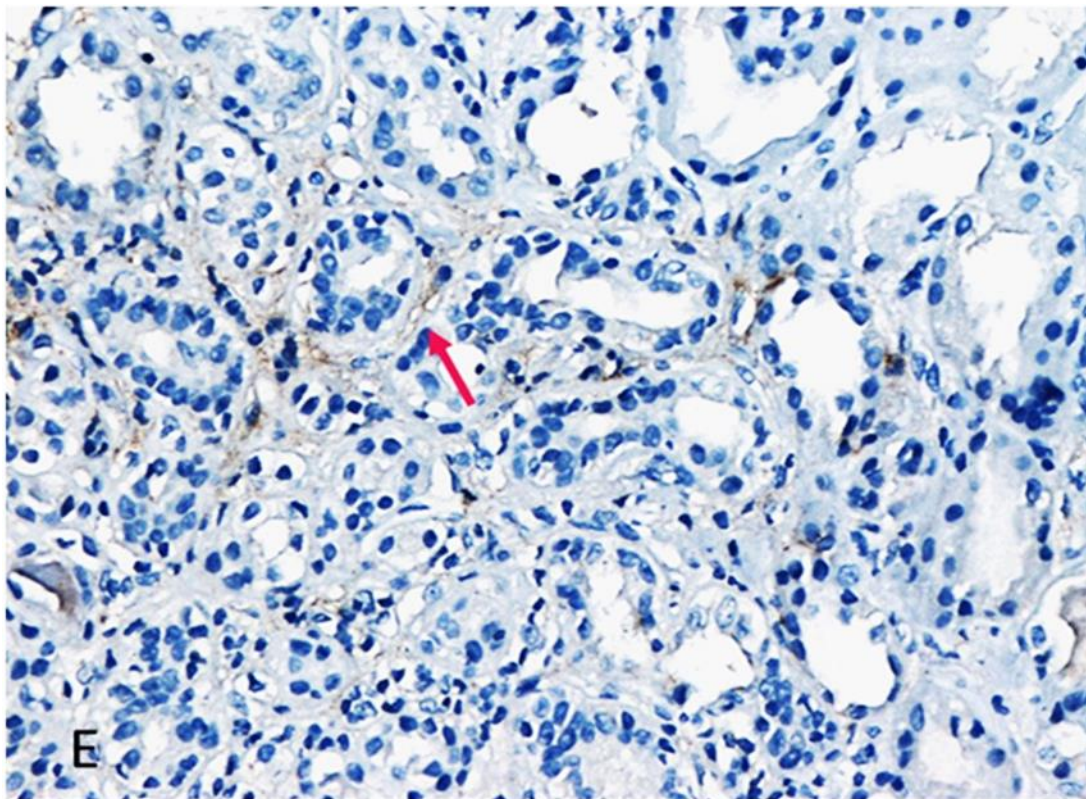
Η pSmad3 εκφράζεται μέτρια μέσα στο σπείραμα, ιδίως στα μεσαγγειακά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Όλοι οι κυτταρικοί μηνοειδείς σχηματισμοί εκφράζουν έντονα τη pSmad3 και χαρακτηριστικά πιο έντονα από τα υπόλοιπα κύτταρα του σπειράματος. Επιπλέον, η χρώση της pSmad3 αποκαλύπτει ένα χαρακτηριστικό περι-πυρηνικό πρότυπο έκφρασης (επίταση της πυρηνικής μεμβράνης). Αντίθετα, η Smad7 εκφράζεται έντονα και με την ίδια ένταση σε όλα τα κύτταρα του σπειράματος και στα κύτταρα του μηνοειδούς σχηματισμού. Στη διαμεσοσωληναριακή περιοχή εκφράζονται μέτρια οι pSmad3 και Smad7, ειδικά στις φλεγμονώδεις διηθήσεις στην περιβωμάνια περιοχή. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο TGF-β1 εκφράζεται στα περισωληναριακά τριχοειδή γύρω από τα σωληνάρια σε περιοχές σωληνίτιδας, καθώς και στη διάμεση ίνωση, ειδικά στη περιβωμάνια ίνωση. (Εικόνα 22)



**Εικόνα 22 A-B.** ANCA-σχετιζόμενη σπειραματονεφρίτιδα (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση), A. pSmad3 χρώση στα φλεγμονώδη κύτταρα στον περισπειραματικό χώρο (αρχική μεγέθυνση x200), B. pSmad3 χρώση στα κύτταρα του μηνοειδούς (βέλος a) και στα σπειραματικά κύτταρα με περιπυρηνικό πρότυπο (βέλος b) (αρχική μεγέθυνση x400)



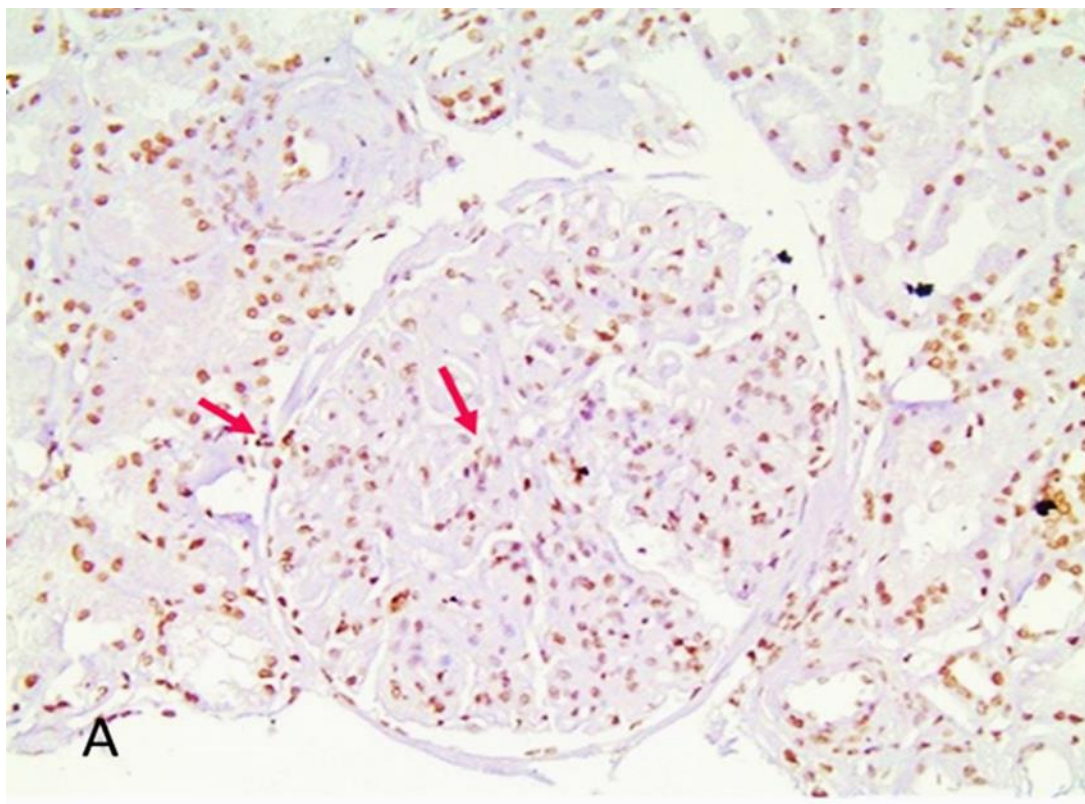
**Εικόνα 22 C-D.** ANCA-σχετιζόμενη σπειραματονεφρίτιδα (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση). C. Smad7 χρώση στα φλεγμονώδη κύτταρα του διάμεσου ιστού (αρχική μεγέθυνση x200), D. Στιγμιότυπο από ψηφιακή ανάλυση εικόνας από το προηγούμενο περιστατικό (C)



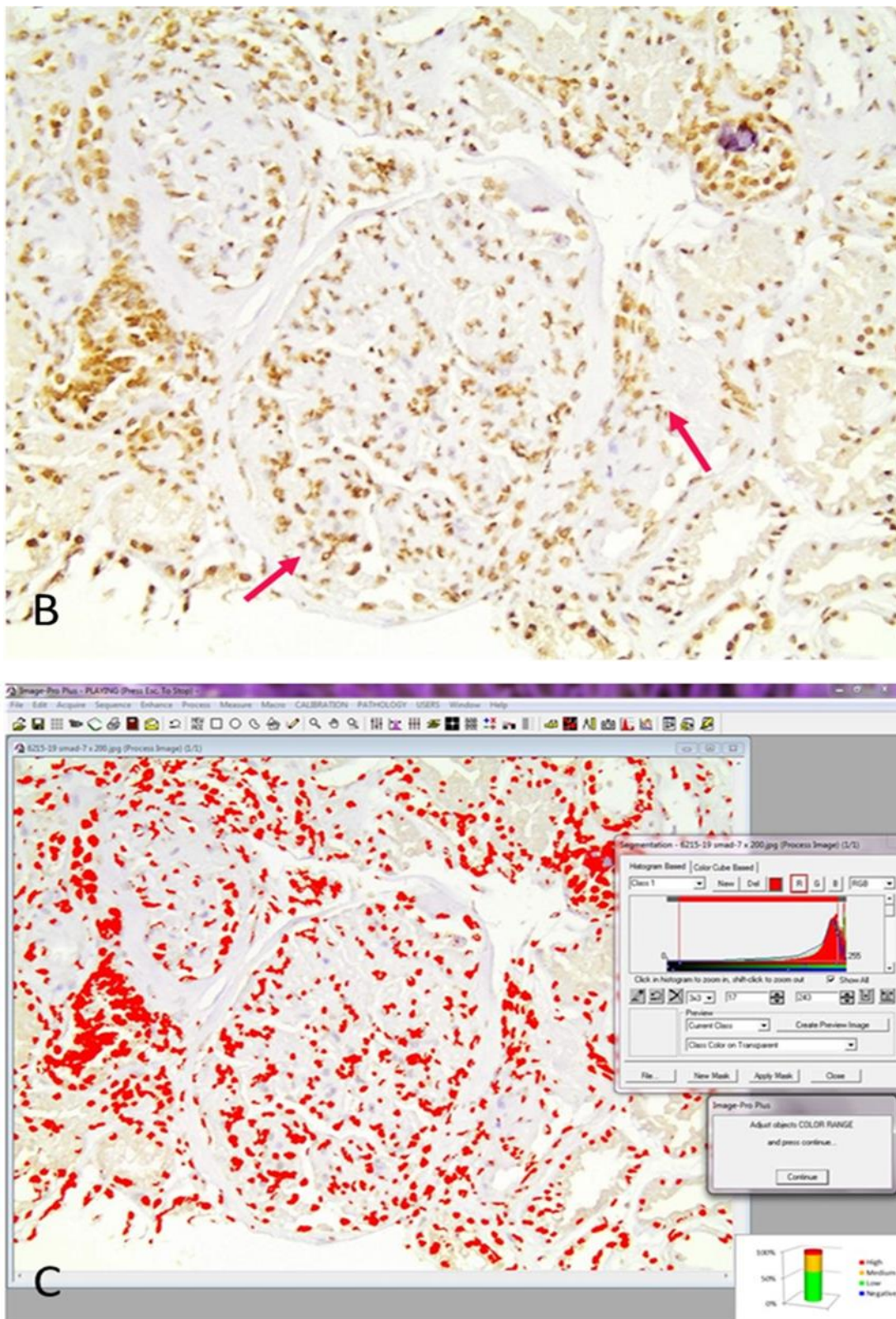
**Εικόνα 22 E-F.** ANCA-σχετιζόμενη σπειραματονεφρίτιδα (τα βέλη δείχνουν τη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση). E. TGF- $\beta$ 1 χρώση γύρω από σωληνίτιδα (αρχική μεγέθυνση x400), F. Στιγμιότυπο από ψηφιακή ανάλυση εικόνας από το προηγούμενο περιστατικό (E)

#### 7.4.5. Σπειραματονεφρίτιδα σχετιζόμενη με Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο

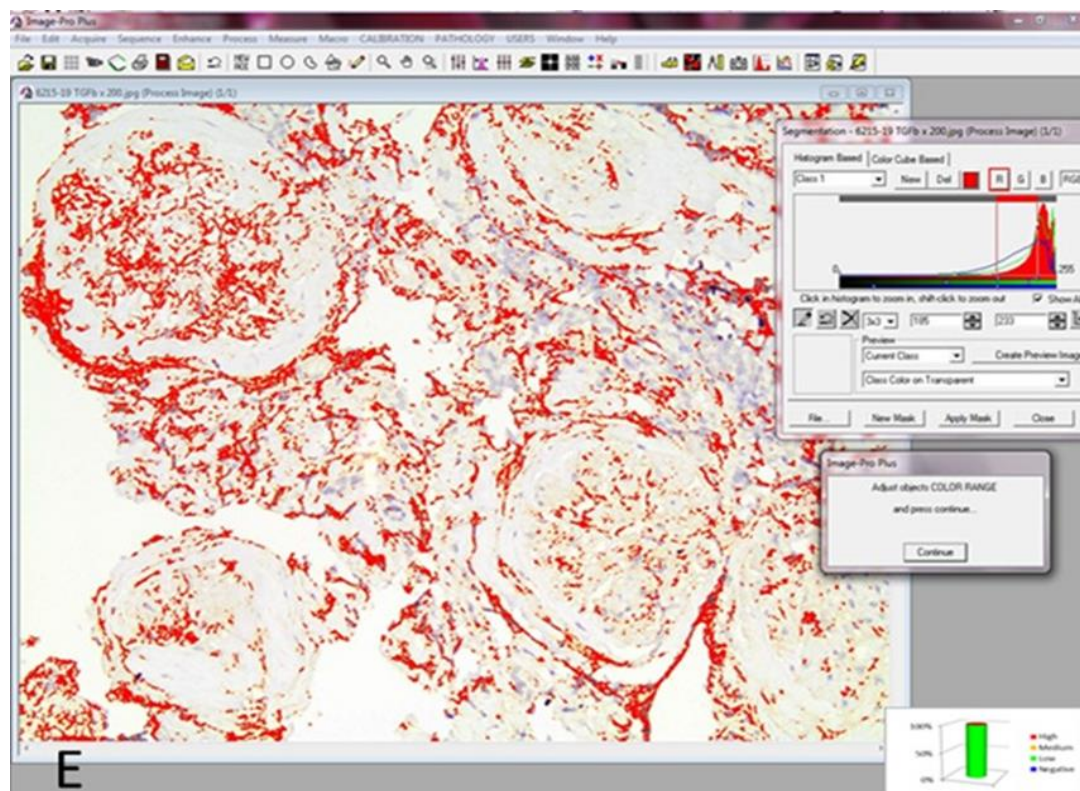
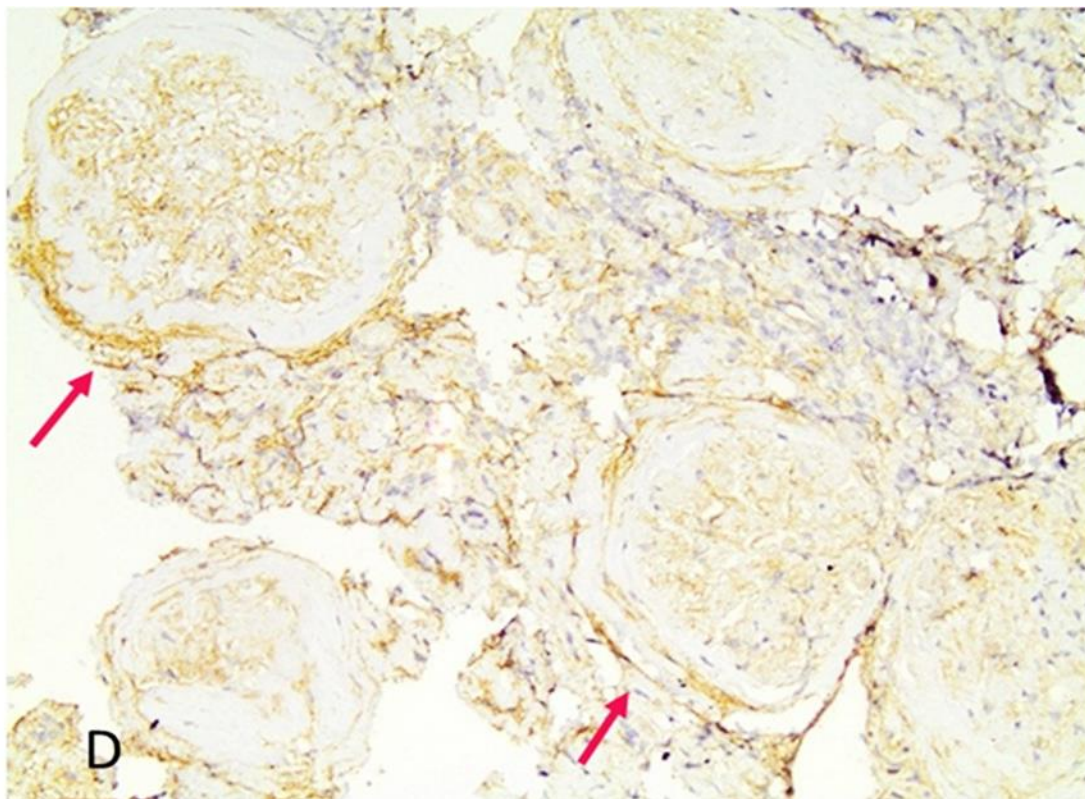
Στη ΣΝ σχετιζόμενη με Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο κυρίως στην υπερπλαστική τάξη (τάξης III ή/και IV), σημειώνεται έντονη έκφραση της pSmad3 στο σπείραμα, στον ίδιο βαθμό στα ενδοθηλιακά και μεσαγγειακά κύτταρα και σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ΣΝ αρκετά έντονα στα τοιχωματικά κύτταρα. Όλοι οι κυτταρικοί μνηοειδείς σχηματισμοί εκφράζουν pSmad3 και Smad7, ενώ περιστασιακά οι ινώδεις μνηοειδείς εκφράζουν TGF-β1. Έντονη έκφραση Smad7 παρατηρούμε σε όλες τις περιοχές (σπείραμα, σωληνάριο και φλεγμονώδη κύτταρα). Σε περιοχές ίνωσης του διάμεσου ιστού, ειδικά στην περιβωμάνια περιοχή, εκφράζεται ο TGF-β1. Επιπλέον, μόνο στα περιστατικά με νεφρίτιδα του λύκου σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ΣΝ, ο TGF-β1 συναντάται εντός σφαιρικά σκληρυσμένου σπειράματος. (Εικόνα 23)



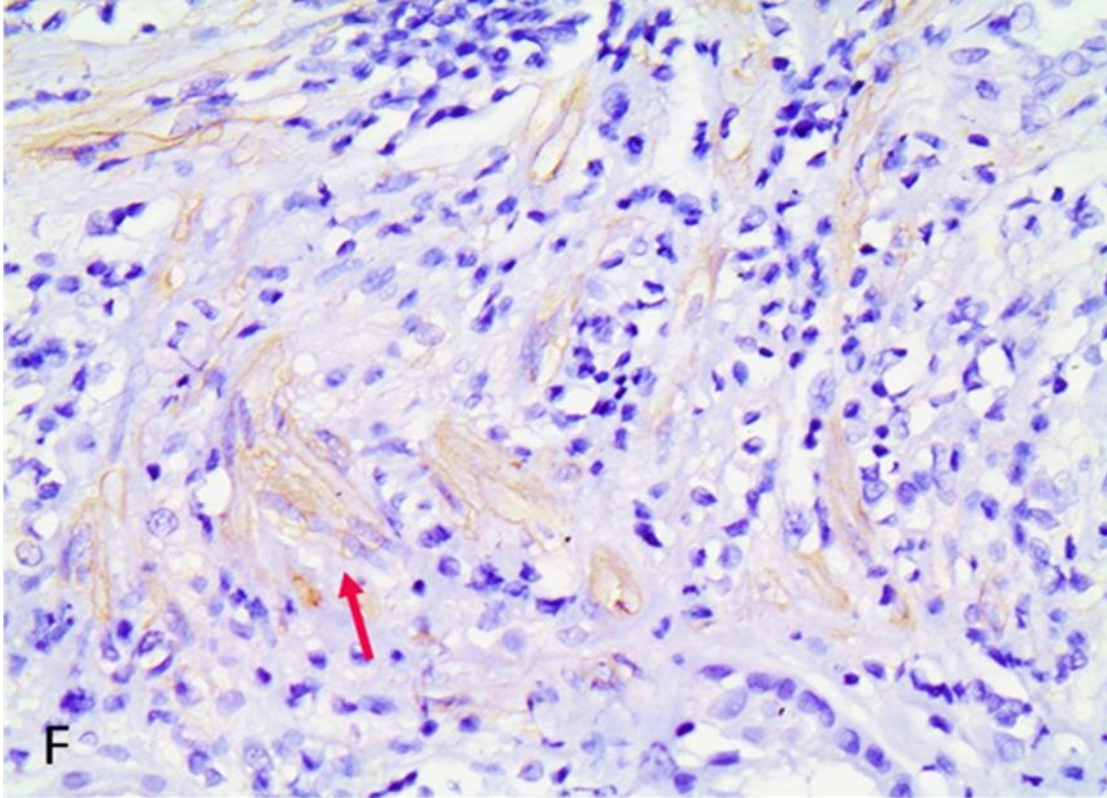
**Εικόνα 23** A. Σπειραματονεφρίτιδα σχετιζόμενη με ΣΕΛ τάξης IV (τα βέλη δείχνουν θετική ανοσοϊστοχημική χρώση), A. pSmad3 χρώση σε τοιχωματικά και μεσαγγειακά κύτταρα (αρχική μεγέθυνση x200)



**Εικόνα 23 B-C.** Σπειραματονεφρίτιδα σχετιζόμενη με ΣΕΛ τάξης IV (τα βέλη δείχνουν θετική ανοσοϊστοχημική χρώση), B. Smad7 χρώση σε σπειραματικά και σωληναριακά κύτταρα (αρχική μεγέθυνση x200), C. Στιγμιότυπο από ψηφιακή ανάλυση εικόνας από το προηγούμενο περιστατικό (B)



**Εικόνα 23 D-E.** Σπειραματονεφρίτιδα σχετιζόμενη με ΣΕΛ τάξης IV (τα βέλη δείχνουν θετική ανοσοϊστοχημική χρώση), D. TGF- $\beta$ 1 χρώση εντός σφαιρικά σκληρυσμένου σπειράματος (αρχική μεγέθυνση x200), E. Στιγμιότυπο από ψηφιακή ανάλυση εικόνας από το προηγούμενο περιστατικό (D)



**Εικόνα 23 F.** Σπειραματονεφρίτιδα σχετιζόμενη με ΣΕΛ τάξης IV (τα βέλη δείχνουν θετική ανοσοϊστοχημική χρώση), F. TGF-β1 χρώση σε διάμεση ίνωση (αρχική μεγέθυνση x400)



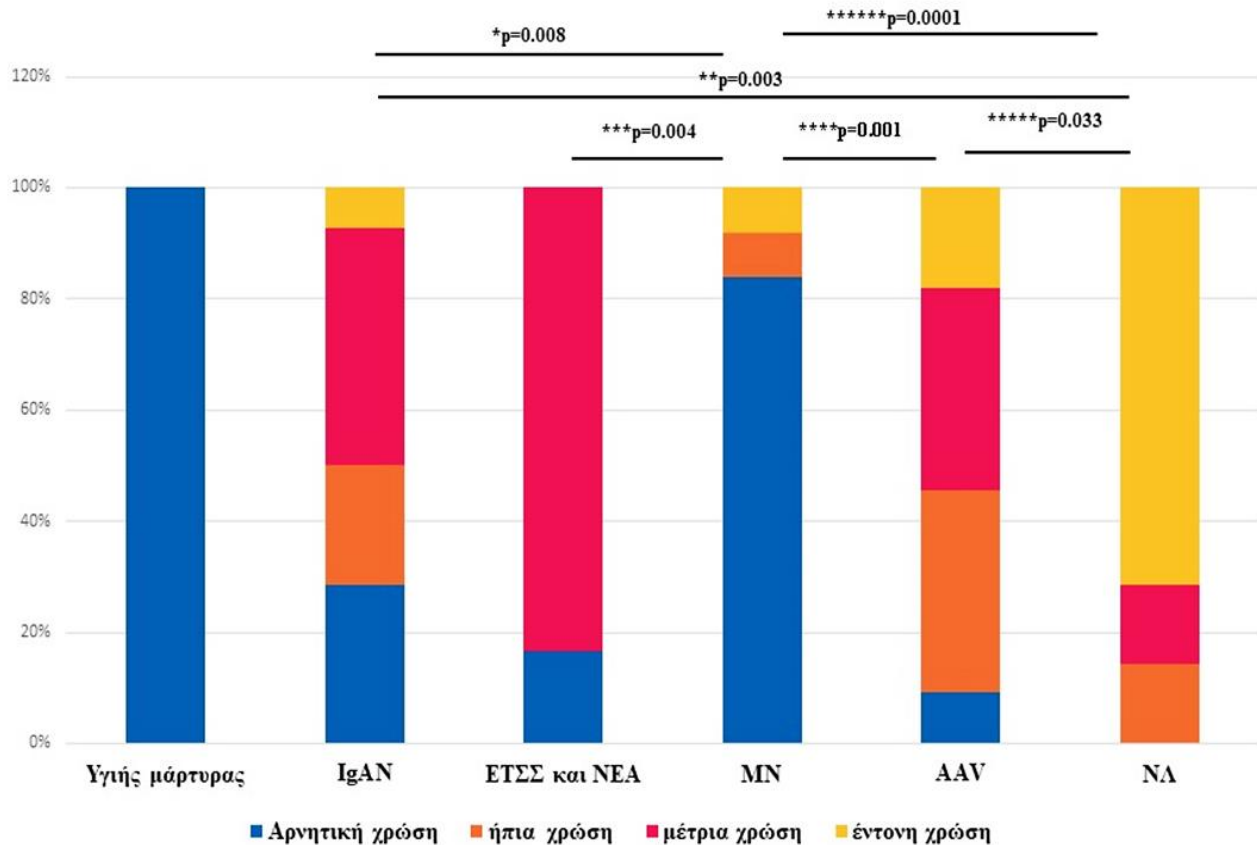
## **7.5 Συσχετίσεις μεταξύ των TGF-β1, pSmad3, Smad7 με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους**

Όσον αφορά τις ιστολογικές παραμέτρους, λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των πειραματικών παθήσεων, η πειραματική έκφραση της pSmad3 συσχετίστηκε θετικά με στοιχεία χρονιότητας, όπως διάμεση ίνωση ( $p=0.087$ ) και κρεατινίνη ορού  $>1,2$  mg/dL κατά τη διάγνωση ( $p=0.069$ ), ενώ η έκφραση στο διάμεσο χώρο συσχετίστηκε θετικά με στοιχεία ενεργότητας, όπως διάμεση φλεγμονή ( $p=0.024$ ) και παρουσία μηνοειδών σχηματισμών ( $p=0.074$ ). Επιπρόσθετα, η παρουσία πειραματικής αιματουρίας σχετίστηκε μόνο με την έκφραση της pSmad3 στη διάμεση φλεγμονή ( $p=0.087$ ). Αντίθετα, η πειραματική έκφραση του TGF-β1 φάνηκε να σχετίζεται θετικά με την τμηματική πειραματοσκλήρυνση ( $p=0.025$ ), ενώ η έκφραση του TGF-β1 στο διάμεσο χώρο σχετίστηκε θετικά με την κρεατινίνη ορού  $>1,2$  mg/dL κατά τη διάγνωση ( $p=0.002$ ) και αρνητικά με επεισόδιο υποτροπής ( $p=0.05$ ). Τέλος, η μέτρια σωληναριακή έκφραση της Smad7 συνδέθηκε με στατιστικά σημαντική σχέση με επεισόδιο υποτροπής ( $p=0.031$ ).

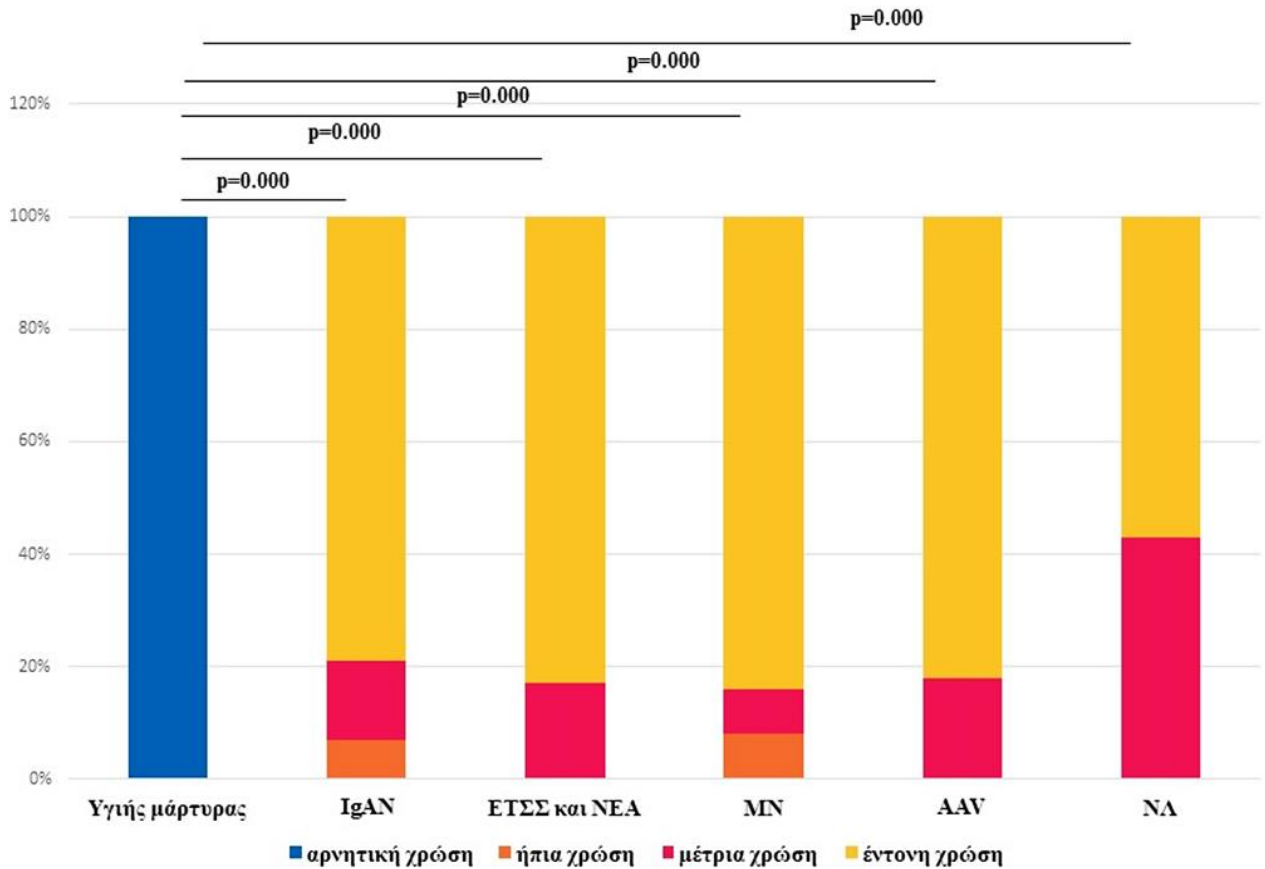
Με βάση τις τρεις μεγάλες υποκατηγορίες των πειραματικών παθήσεων (IgA νεφροπάθεια, υπερπλαστικές και μη υπερπλαστικές ΣΝ), αρχικά στους ασθενείς με υπερπλαστική ΣΝ καταγράφηκε συσχέτιση μεταξύ της πειραματικής έκφρασης της pSmad3 και της τιμής κρεατινίνης ορού στη διάγνωση ( $p=0.044$ ). Συμπληρωματικά, σε αυτούς τους ασθενείς η συνολική έκφραση του TGF-β1 (σπείραμα και σωληναριοδιάμεσος χώρος) σχετίστηκε με τη σφαιρική πειραματοσκλήρυνση ( $p=0.07$ ) και με  $>25\%$  σωληναριακή ατροφία ( $p=0.09$ ). Επιπλέον, η pSmad3 παρουσιάζει προτιμητέα έκφραση στα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα του σπειράματος ( $p=0.045$ ). Αφετέρου, στους ασθενείς με μη υπερπλαστική ΣΝ, η pSmad3 παρουσιάζει προτιμητέα έκφραση στα ποδοκύτταρα σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα του σπειράματος ( $p=0.005$ ), ενώ η Smad7 παρουσιάζει αντίστροφη σχέση με τη σφαιρική πειραματοσκλήρυνση ( $p=0.05$ ). Τέλος, στους ασθενείς με IgA νεφροπάθεια καταγράφηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ pSmad3 και έκφρασης στα μεσαγγειακά κύτταρα ( $p=0.05$ ).

## **7.6 Η έκφραση των TGF-β1, pSmad3 και Smad7 συγκριτικά ανάμεσα στους μάρτυρες και στις διάφορες σπειραματονεφρίτιδες**

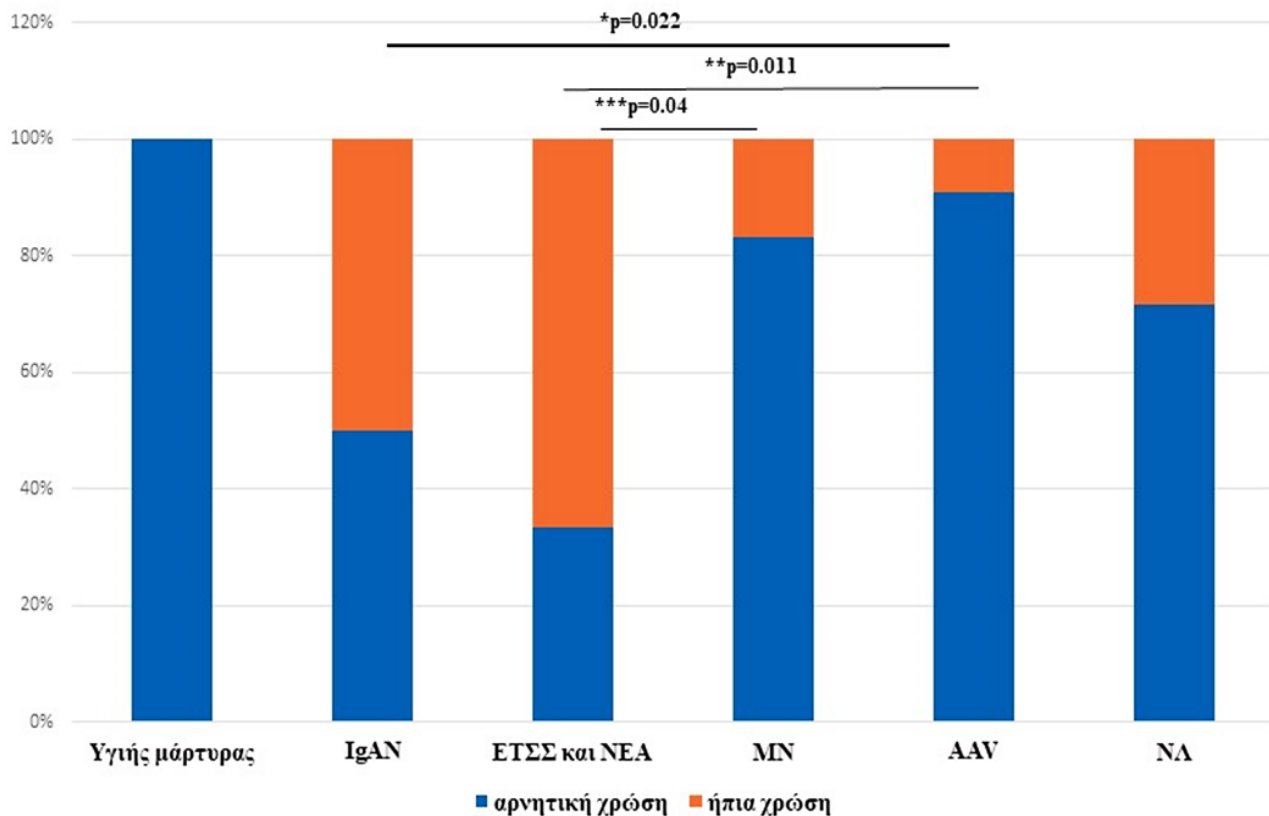
Το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β1/pSmad3 είναι ενεργοποιημένο σε όλες τις μορφές των σπειραματικών παθήσεων που εξετάστηκαν (Εικόνες 24-26). Συγκεκριμένα, όταν συγκριθούν με τους υγιείς μάρτυρες, η σπειραματική έκφραση του TGF-β1 ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς με ΕΤΣΣ/ΝΕΑ και IgAN (**p=0.020**, **p=0.045**, αντίστοιχα), η σπειραματική έκφραση της pSmad3 ήταν αυξημένη σε όλες τις ΣΝ, εκτός της MN (ΝΛ, **p=0.000**, ΕΤΣΣ/ΝΕΑ, **p=0.005**, IgAN, **p=0.013**, ANCA-σχετιζόμενη ΣΝ, **p=0.03**) με εμφανή υπεροχή στη ΝΛ έναντι των υπολοίπων και η σπειραματική έκφραση Smad7 ήταν αυξημένη σε όλες τις ΣΝ (όλες, **p=0.000**), χωρίς ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των υποκατηγοριών. (Εικόνες 24-26)



**Εικόνα 24: pSmad3 πειραματική έκφραση σε όλες τις ΣΝ και στους υγιείς μάρτυρες. (% ασθενείς) (IgAN, IgA νεφροπάθεια, ΕΤΣΣ, εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, ΝΕΑ, νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων, ΜΝ, μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια, ΑΑV, ANCA-σχετιζόμενη ΣΝ, ΝΛ, ΣΝ σχετιζόμενη με τον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο, p, p value) \*σύγκριση μεταξύ IgAN και ΜΝ, \*\* σύγκριση μεταξύ IgAN και ΝΛ, \*\*\* σύγκριση μεταξύ ΕΤΣΣ+ΝΕΑ με ΜΝ, \*\*\*\* σύγκριση μεταξύ ΜΝ και ΑΑV, \*\*\*\*\* σύγκριση μεταξύ ΑΑV και ΝΛ, \*\*\*\*\* σύγκριση μεταξύ ΝΛ και ΜΝ,  $p < 0.05$  στατιστικά σημαντικό.**

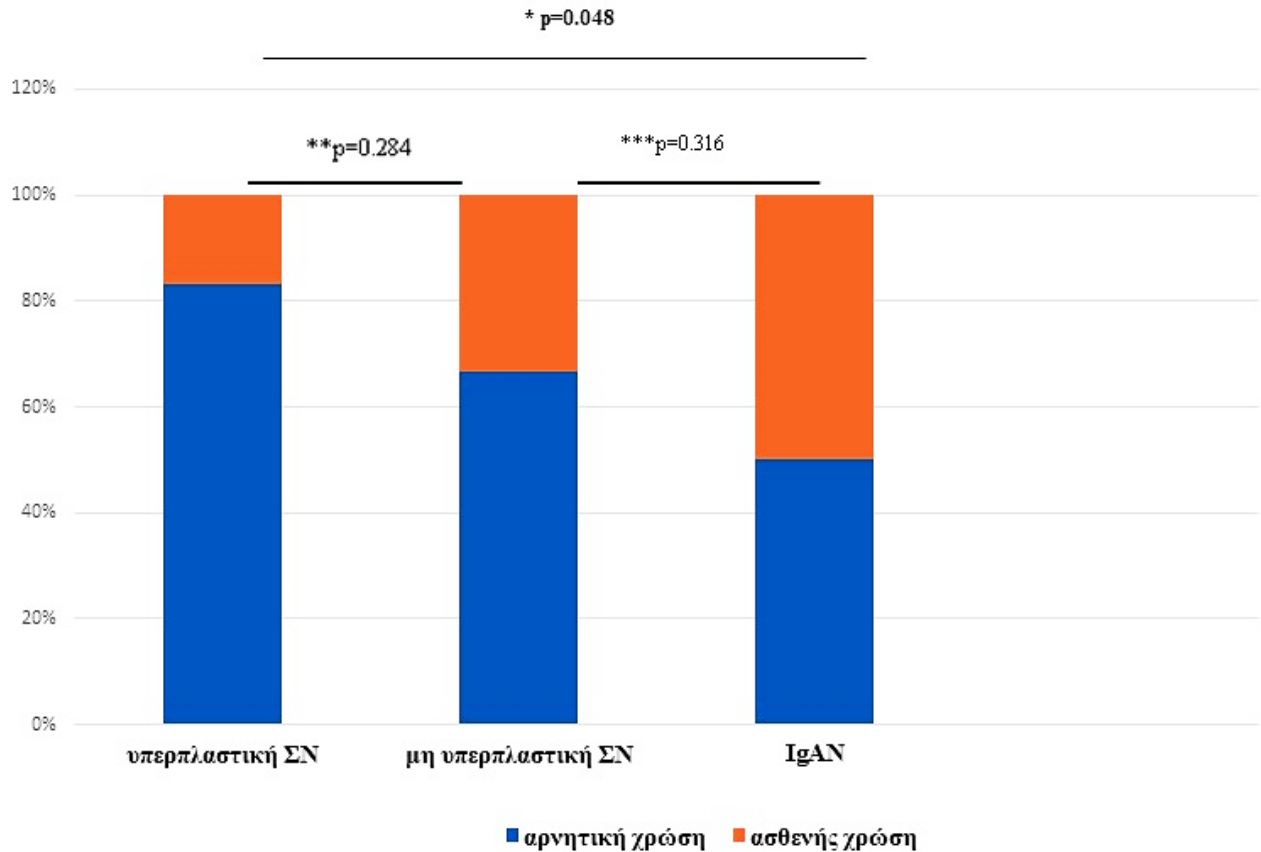


**Εικόνα 25: Smad7 σπειραματική έκφραση σε όλες τις ΣΝ και στους υγιείς μάρτυρες. (% ασθενείς) (IgAN, IgA νεφροπάθεια, ΕΤΣΣ, εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, ΝΕΑ, νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων, ΜΝ, μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια, ΑΑV, ANCA-σχετιζόμενη ΣΝ, ΝΛ, ΣΝ σχετιζόμενη με τον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο) (οι συγκρίσεις μεταξύ των ΣΝ χωρίς στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα,  $p>0.05$ )**



**Εικόνα 26. TGF-β1 σπειραματική έκφραση σε όλες τις ΣΝ και στους υγιείς μάρτυρες. (% ασθενείς) (IgAN, IgA νεφροπάθεια, ΕΤΣΣ, εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, ΝΕΑ, νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων, ΜΝ, μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια, ΑΑV, ANCA-σχετιζόμενη ΣΝ, ΝΑ, ΣΝ σχετιζόμενη με τον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο) \* σύγκριση μεταξύ IgAN με ΑΑV, \*\* σύγκριση μεταξύ ΕΤΣΣ+ΝΕΑ με ΑΑV, \*\*\* σύγκριση μεταξύ ΕΤΣΣ+ΝΕΑ με ΜΝ,  $p < 0.05$  στατιστικά σημαντικό.**

Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ των 3 μεγαλύτερων υποκατηγοριών ΣΝ (υπερπλαστική, μη υπερπλαστική, IgAN), παρόλο που η πειραματική έκφραση του TGF-β1 ήταν πιο έντονη στη μη υπερπλαστική ΣΝ σε σχέση με την υπερπλαστική ΣΝ, η διαφορά τους δεν αποτελεί στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (Εικόνα 26).



**Εικόνα 27. TGF-β1 πειραματική έκφραση σε υπερπλαστική, μη υπερπλαστική και IgA νεφροπάθεια (% ασθενείς).** \* σύγκριση μεταξύ υπερπλαστικής ΣΝ και IgAN, \*\* σύγκριση μεταξύ υπερπλαστικής ΣΝ και μη υπερπλαστικής ΣΝ, \*\*\* σύγκριση μεταξύ μη υπερπλαστικής ΣΝ και IgAN,  $p < 0.05$  στατιστικά σημαντικό

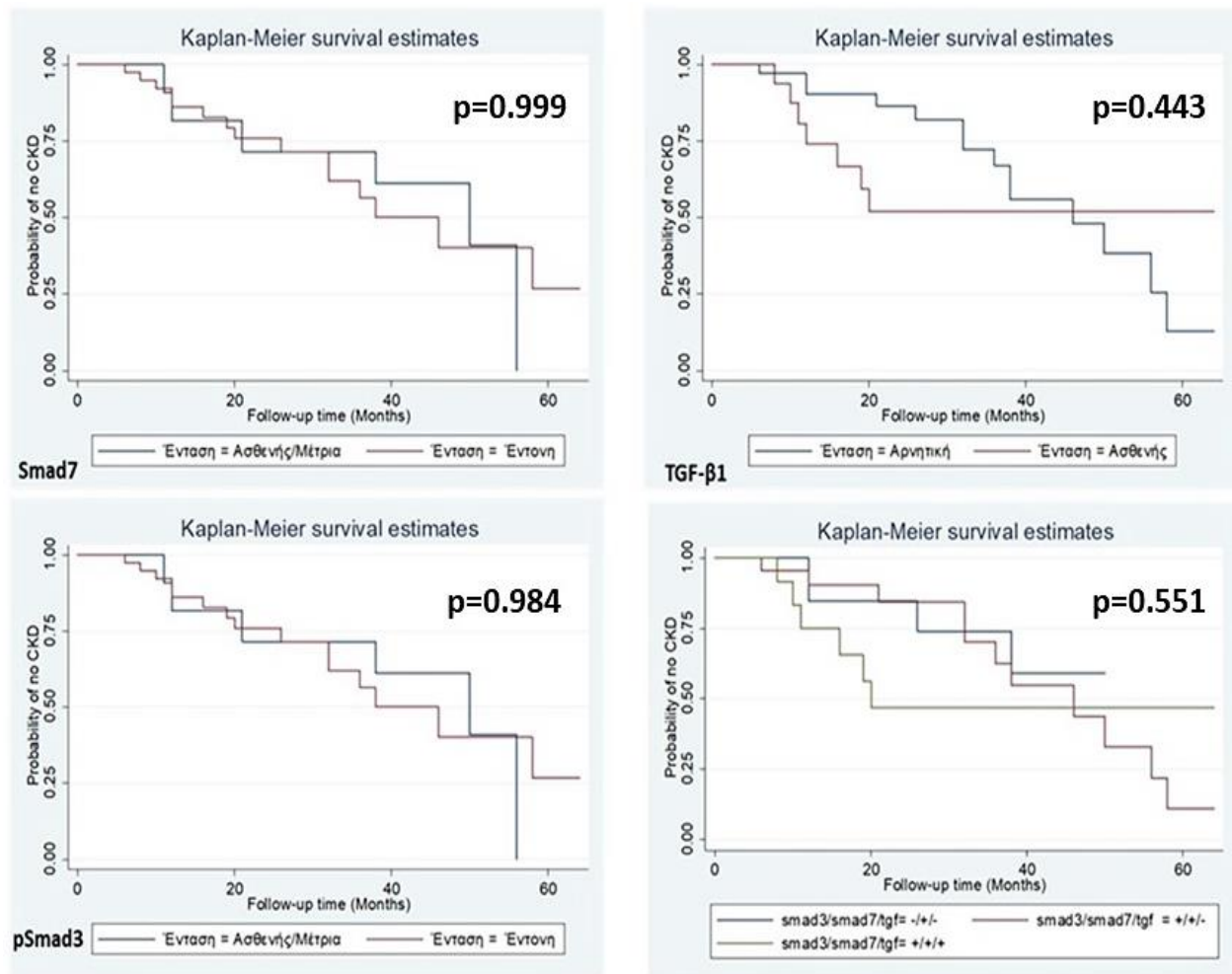
### **7.7 Η ισορροπία των TGF-β1, pSmad3, Smad7 και ποσοτικά πρότυπα έκφρασης στο σπείραμα**

Καγράφηκε θετική δόσοεξαρτώμενη σχέση στο σπείραμα ανάμεσα στις εκφράσεις των TGF-β1 και pSmad3 (**p=0.045**), αλλά δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική αντίστροφη σχέση μεταξύ των TGF-β1 και Smad7 ( $p=0.434$ ). Για να διερευνηθεί περαιτέρω η ισορροπία αυτή, ελέγξαμε διάφορα πρότυπα έκφρασης. Οι βιοψίες που εκφράζανε ταυτόχρονα στο σπείραμα pSmad3 (μέτρια ή έντονη) και Smad7 (έντονη), παρουσίαζαν χαμηλά επίπεδα στον ορό C3 (**p=0.028**) και C4 (**p=0.029**), περισσότερους κυτταρικούς μηνοειδείς σχηματισμούς (**p=0.011**) και πιο έντονη διάμεση φλεγμονή (**p=0.029**), σε σύγκριση με τις βιοψίες που παρουσίαζαν Smad7 (έντονη) και αρνητική pSmad3. Επιπρόσθετα, η αρνητική έκφραση TGF-β1 στο σπείραμα στο προαναφερόμενο πρότυπο συσχετίστηκε επίσης με την παρουσία κυτταρικών μηνοειδών σχηματισμών (**p=0.025**).

## **7.8 Εξέλιξη στη χρόνια νεφρική νόσο (XNN)**

Κατά τη διάρκεια περίπου μέσου χρόνου παρακολούθησης 5 έτη, το ποσοστό ασθενών που παρουσίασε εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής νόσου αποτελούσε το 44%. Αρχικά, το μονοπαραγοντικό μοντέλο αναλογικών κινδύνων Cox αποκάλυψε διάφορους παράγοντες κινδύνου (παραδοσιακούς) που σχετίζονται με την εξέλιξη, όπως η τιμή κρεατινίνης κατά τη διάγνωση, η πρωτεϊνουρία κατά τη διάγνωση, η σφαιρική σπειραματοσκλήρυνση >45%, η διάμεση ίνωση >25% και οι μηνοειδείς σχηματισμοί (όλα  $p < 0.05$ ) Επίσης ελέγχθηκαν ως προς την εξέλιξη στη XNN, ξεχωριστά η έκφραση των πρωτεϊνών pSmad3, Smad7, TGF- $\beta$ 1 και οι πιθανοί εκφραστικοί συνδυασμοί τους (όλα  $p > 0.05$ ) (Εικόνα 28). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση όμως αναλύοντας ταυτόχρονα τα δεδομένα, η σπειραματική έκφραση TGF- $\beta$ 1 φάνηκε να σχετίζεται με εξαπλάσιο κίνδυνο εξέλιξης στη XNN στο σύνολο των σπειραματικών παθήσεων (**HR=6.078, 95%CI 1.168-31.627, p=0.032**) με πιο στατιστικά σημαντική σχέση να διακρίνεται στην υπερπλαστική ΣΝ (**HR=17.19, 95%CI 1.49, 197.67, p=0.022**). (Εικόνα 28, Πίνακας 3)





**Εικόνα 28.** Καμπύλες επιβίωσης (long-rank test) για Smad7, TGF-β1, pSmad3 και οι συνδυασμοί τους για την εξέλιξη στη χρόνια νεφρική νόσο (XNN).

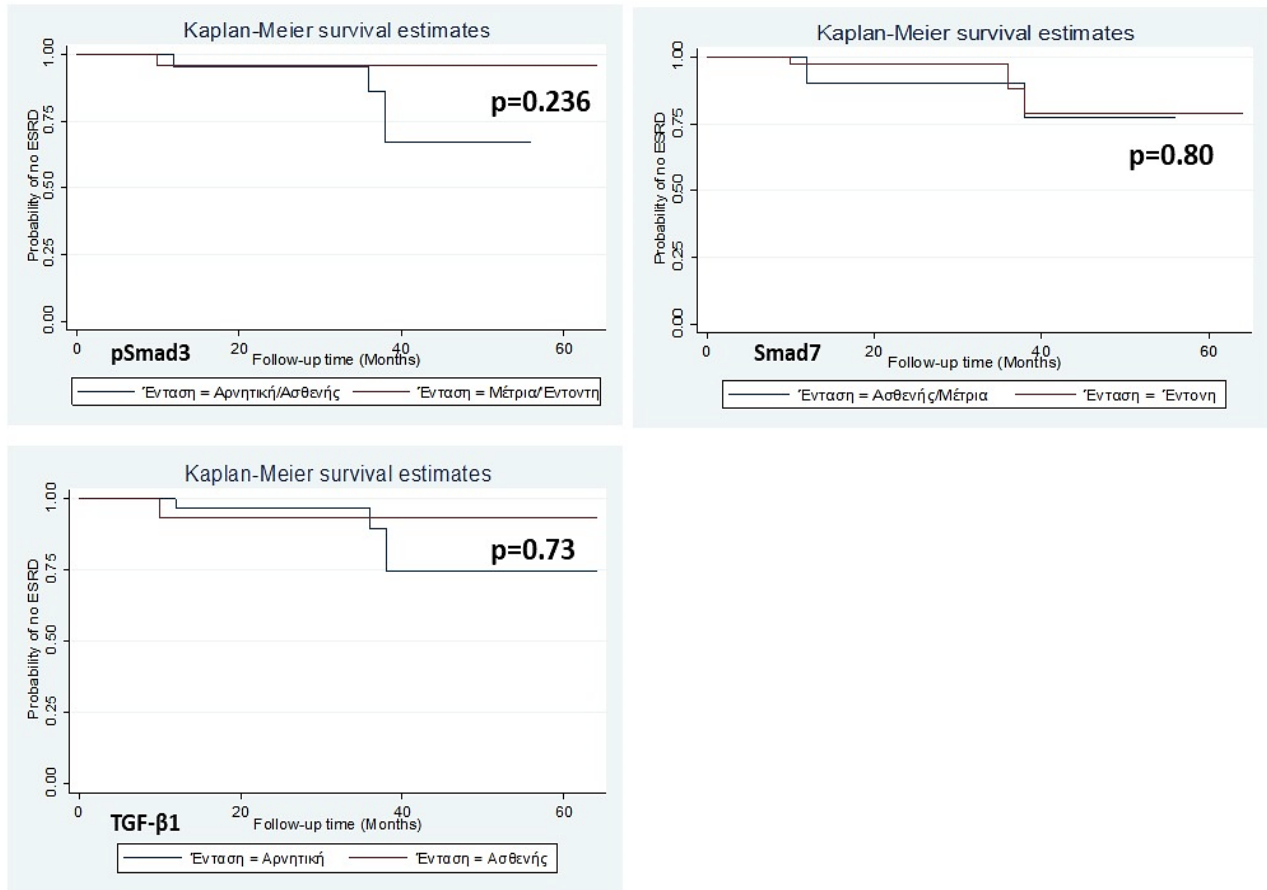
**Πίνακας 3. Μονοπαραγοντικό και πολυπαραγοντικό μοντέλο αναλογικών κινδύνων Cox για εξέλιξη στη χρόνια νεφρική νόσο (XNN)**

	Μονοπαραγοντική		Πολυπαραγοντική	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Ηλικία	1.02 (0.992-1.049)	0.156	1.011 (0.962-1.055)	0.614
Κρεατινίνη ορού στη διάγνωση	1.184 (1.052-1.332)	<b>0.05</b>	1.136 (0.139-1.040)	0.299
Πρωτεϊνουρία στη διάγνωση	0.92 (0.855-0.933)	<b>0.032</b>	0.923 (0.822-1.035)	0.172
Σφαιρική σπειραματοσκλήρυνση >45%	21.839 (2.439-195.53)	0.06	9.239 (0.525-162.594)	0.129
Διάμεση ίνωση >25%	3.571 (1.431-8.91)	<b>0.006</b>	1.572 (0.414-5.970)	0.506
Μηνοειδείς σχηματισμοί	3.581 (1.441-8.898)	<b>0.006</b>	1.284 (0.252-6.550)	0.763
pSmad3 σπείραμα	1.63 (0.539-4.925)	0.387	1.297 (0.251-6.713)	0.756
Smad7 σπείραμα	1 (0.378-2.642)	1	0.348 (0.087-1.399)	0.137
<b>TGF-β1 σπείραμα (σύνολο)</b>	1.423 (0.57-3.555)	0.76	<b>6.078 (1.168-31.627)</b>	<b>0.032</b>
<b>TGF-β1 σπείραμα- υπερπλαστικές</b>			<b>17.19 (1.49, 197.67)</b>	<b>0.022</b>
TGF-β1 σπείραμα- μη υπερπλαστικές			9.05 (0.27, 303.22)	0.219
TGF-β1 σπείραμα-IgA νεφροπάθεια			1.77 (0.11, 27.73)	0.685

HR, Hazard ratio; CI, confidence interval; pSmad3, phosphorylated Smad3

## 7.9 Εξέλιξη σε χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου (XNNTΣ)

Κατά τη διάρκεια περίπου μέσου χρόνου παρακολούθησης 5 έτη, το ποσοστό ασθενών που παρουσίασε XNNTΣ αποτελούσε το 10%. Ελέγχθηκαν στη μονοπαραγοντική ανάλυση ξεχωριστά η έκφραση των πρωτεϊνών pSmad3, Smad7 και TGF-β1 ως προς την εξέλιξη σε XNNTΣ, χωρίς να προκύπτει όμως κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. (Εικόνα 29).



**Εικόνα 29.** Καμπύλες επιβίωσης (long-rank test) για Smad7, TGF-β1, pSmad3 για εξέλιξη σε χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου (XNNTΣ).

## 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παραπάνω μελέτη επισημαίνει ότι στην ΣΝ στον άνθρωπο το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β1/Smad είναι ενεργοποιημένο, με χαρακτηριστικά εκφραστικά πρότυπα διαφορετικά σε κάθε τύπο σπειραματικής βλάβης, τα οποία σχετίζονται με τη νεφρική παθογένεια (φλεγμονή ή/και ίνωση). Για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μας ορίζουν την σπειραματική έκφραση TGF-β1 ως παράγοντα κινδύνου για νεφρική εξέλιξη, ανεξαρτήτως του τύπου της σπειραματικής πάθησης.

Είναι κοινώς αποδεκτό ότι ο TGF-β1 σχετίζεται με τη διάμεση ίνωση και τη σπειραματοσκλήρυνση σε ζωικά και ανθρώπινα μοντέλα, όπως στη διαβητική νεφροπάθεια, στην αποφρακτική νεφροπάθεια, στην υπερτασική νεφροπάθεια και στην σπειραματονεφρίτιδα [142,266]. Μελέτες σε ανθρώπινα μοντέλα, όπως σε IgA νεφροπάθεια, ΕΤΣΣ, μηνοειδική ΣΝ και νεφρίτιδα του λύκου δείχνουν αυξημένη έκφραση του TGF-β1 στο σπείραμα και στο διαμεσοσωληναριακό χώρο [266]. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, αναφέρουμε αυξημένη έκφραση του TGF-β1 σε όλες τις μορφές ΣΝ που εξετάστηκαν (IgAN, ΕΤΣΣ, ΝΕΑ, ΝΛ, ΑΑV, ΜΝ) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες [142,266].

Στην ΕΤΣΣ, επιβεβαιώσαμε τα αποτελέσματα από μία προηγούμενη μελέτη, όπου η έκφραση του TGF-β1 βρέθηκε αυξημένη στην περιοχή της τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης και στη διάμεση ίνωση, αλλά επιπλέον παρατηρήσαμε ότι σποραδικά βρέθηκε αυξημένη στην περισπειραματική περιοχή των φυσιολογικών σπειραμάτων, πιθανώς ενοχοποιώντας τον εν δυνάμει ρόλο των περισπειραματικών ινοβλαστών στη σπειραματική βλάβη [267]. Επιπλέον, η έκφραση του TGF-β1 και της Smad3 φάνηκε να υπερισχύει στατιστικά σημαντικά στη νεφρίτιδα του λύκου έναντι των υπολοίπων σπειραματικών παθήσεων και σε ένταση και στην καθολικότητα των νεφρικών κυττάρων, όπως χαρακτηριστικά μόνο εδώ εκφράζονται στα τοιχωματικά επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος. Αρκετά έντονα αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τη νεφρίτιδα του λύκου φάνηκε να εκφράζονται ο TGF-β1 και η Smad3 στην ANCA-σχετιζόμενη ΣΝ. Εδώ συγκεκριμένα περιγράψαμε ένα ειδικό περιτυρητικό πρότυπο έκφρασης της pSmad3 που μπορεί να υποδηλώνει διαφορετικές λειτουργίες σε σχέση με τις υπόλοιπες ΣΝ, ενώ ο TGF-

$\beta 1$  εκφράζεται έντονα στα περισωληνιαρικά κύτταρα γύρω από περιοχές σωληνίτιδας, καθιστώντας το ρόλο του εμφανή στη φλεγμονή και του σωληνιακού κυττάρου.

Παρόλο αυτά, υπάρχει μία διχογνωμία στη σύγκριση όσον αφορά την έκφραση του TGF- $\beta 1$  ανάμεσα σε υπερπλαστικές και μη υπερπλαστικές ΣΝ. Εν μέρει, έχει αποδειχτεί ότι η έκφραση του TGF- $\beta 1$  είναι πιο έντονη σε σοβαρές υπερπλαστικές βλάβες [266], αλλά πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι το mRNA του TGF- $\beta 1$  είναι περισσότερο αυξημένο στις ποδοκυττοπάθειες παρά στις υπερπλαστικές ΣΝ ή στην IgAN [268]. Πιθανώς, αυτή η διχογνωμία αντανακλά διαφορές στο πρωτόκολλο της ανοσοϊστοχημείας ή στη χρήση ενός διαφορετικού αντισώματος, ή διαφορές στο δείκτη ενεργότητας/ χρονιότητας των πειραματικών παθήσεων, τις οποίες περιλαμβάνει η κάθε μελέτη. Στα αποτελέσματα μας, ο TGF- $\beta 1$  (σπείραμα και διαμεσοσωληνιακός χώρος) εκφράζεται εξίσου και στις υπερπλαστικές και στις μη υπερπλαστικές ΣΝ. Αν και καταγράψαμε πιο συχνή έκφραση στις μη υπερπλαστικές, η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Η μελέτη μας είναι η πρώτη που αξιολογεί το ρόλο της έκφρασης του TGF- $\beta 1$  ως προγνωστικό παράγοντα για την εξέλιξη της νεφρικής νόσου. Λαμβάνοντας υπόψη όλες τις ΣΝ, το καινοτόμο εύρημα στη μελέτη μας είναι ότι η πειραματική έκφραση του TGF- $\beta 1$  αποδείχτηκε ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για εξέλιξη στη ΧΝΝ (μέσος χρόνος παρακολούθησης περίπου 5 χρόνια). Μέχρι τώρα, καμία άλλη μελέτη στην αγγλική βιβλιογραφία δεν έχει ελέγξει το ρόλο του TGF- $\beta 1$  ως παράγοντα κινδύνου για εξέλιξη στη νεφρική νόσο. Με βάση την προγνωστική αξία, θα μπορούσε επιπλέον να χρησιμοποιηθεί για να καθοριστεί η κατάλληλη θεραπευτική στρατηγική.

Πρέπει να σημειωθεί ότι εκτός από το ρόλο του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF- $\beta 1$ /pSmad3 στην ίνωση, ασκεί επίσης και αντιφλεγμονώδεις δράσεις [177, 178]. Τα αποτελέσματα μας όχι μόνο επιβεβαιώνουν ότι η έκφραση της pSmad3 σχετίζεται με τη διάμεση ίνωση, όπως έχει φανεί από προηγούμενους ερευνητές [237], αλλά ανακαλύψαμε ότι η έκφραση του σχετίζεται επίσης με τη νεφρική φλεγμονή, όπως οι μηνοειδείς σχηματισμοί και η διάμεση φλεγμονή. Πρόσφατα, σε μία πειραματικά ανοσολογικώς μεσολαβούμενη ΣΝ βρέθηκε ότι σημαντικές αλλαγές στα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα ήταν pSmad3 εξαρτώμενες, σε αντίθεση με τα ποδοκύτταρα [195]. Στην παρούσα μελέτη, περιγράψαμε ότι η pSmad3 στην υπερπλαστική ΣΝ, σε αντίθεση με

τη μη υπερπλαστική ΣΝ, παρουσιάζει μια προτιμητέα έκφραση στα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα μας επιβεβαίωσαν ότι η pSmad3 εκφράζεται στους μηνοειδείς σχηματισμούς, όπως προηγουμένως έχει φανεί [269]. Είναι αξιοσημείωτο ότι επεκτείναμε αυτή την παρατήρηση και καταγράψαμε διαφορετικά πρότυπα έκφρασης στους μηνοειδείς σχηματισμούς. Στην AAV, όλα τα κύτταρα μέσα στο μηνοειδή σχηματισμό εκφράζουν πιο έντονα pSmad3, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα πειραματικά κύτταρα του ίδιου πειράματος, στη νεφρίτιδα του λύκου καταγράφηκε η ίδια ένταση, ενώ στην IgA νεφροπάθεια η pSmad3 εκφράζεται μόνο στα κύτταρα μέσα στο μηνοειδή σχηματισμό. Εικάζουμε ότι αυτή η διαφορετική έκφραση της pSmad3 στους μηνοειδείς σχηματισμούς, στις διάφορες ΣΝ μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι οι μηνοειδείς σχηματισμοί έχουν διαφορετική πρόγνωση στις παραπάνω παθήσεις. Αυτή η παρατήρηση όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνηση.

Η Smad7 πρωτεΐνη θεωρείται αρνητικός παράγοντας ανατροφοδότησης και επομένως η αυξημένη έκφραση του μπορεί να καταστείλει την έκφραση των TGF-β1 και Smad και έτσι να μειώσει τη νεφρική ίνωση, αλλά επίσης να μειώσει και τη φλεγμονή, συμμετέχοντας/ αναστέλλοντας ταυτόχρονα το μονοπάτι NF-kB. Κατά συνέπεια, αναστέλλοντας τη Smad3 και επάγοντας τη Smad7 έχει φανεί ότι βελτιώνεται η νεφρική ίνωση σε διάφορα νεφρικά μοντέλα, όπως στην αποφρακτική νεφροπάθεια, στη διαβητική νεφροπάθεια, στην υπερτασική νεφροπάθεια, όπου η έκφραση της Smad7 είναι αρκετά μειωμένη [270]. Παρόλο αυτά, η προσέγγιση αυτή έχει κάποιους περιορισμούς καθώς έχει φανεί ότι η αυξημένη έκφραση Smad7 έχει συσχετιστεί επιπλέον με απόπτωση των ποδοκυττάρων [194]. Όσον αφορά τη δικιά μας μελέτη, παρατηρήσαμε ότι η Smad7 εκφράζεται έντονα σε όλους τους τύπους ΣΝ, όπως λίγες μελέτες έχουν δείξει [261, 262], σε αντίθεση με νεφρικές παθήσεις όπως διαβητική και υπερτασική νεφροπάθεια. Αυτή η απόκλιση κυρίως αντανακλά ότι στη ΣΝ υπάρχει μία δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ ίνωσης και φλεγμονής και υπάρχει προς τα πάνω ρύθμιση διασταυρούμενων μονοπατιών, όπως το NF-kB. Συγχρόνως έχει αναφερθεί ότι σε μεσαγγειακά κύτταρα ποντικών το mRNA της Smad7 επάγεται από τον TGF-β1 πιθανώς με δοσοεξαρτώμενο τρόπο [270]. Όλα τα παραπάνω μας κάνουν να αναρωτηθούμε, εάν υπάρχει κάποιος ουδός

ενεργοποίησης της Smad7, πάνω από τον οποίο ινωτική ή αντι-φλεγμονώδης απάντηση θα πραγματοποιηθεί και θα υπερισχύσει/ανασταλεί, ή εάν υπάρχει όντως δοσοεξαρτώμενη απάντηση της Smad7 και ποια είναι η σημασία της. Αν και στη παρούσα μελέτη βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ TGF-β1 και pSmad3, δεν μπορέσαμε να φτάσουμε σε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, όσον αφορά τη σχέση μεταξύ των TGF-β1 και Smad7. Επομένως, εξετάσαμε κάποια πρότυπα ταυτόχρονης έκφρασης των TGF-β1, pSmad3 και Smad7 στο σπείραμα. Αξίζει να σημειώσουμε ότι η ταυτόχρονη έντονη έκφραση Smad7 και μέτρια έκφραση pSmad3, με αρνητική έκφραση του TGF-β1 σχετίστηκε κυρίως με στοιχεία έντονης φλεγμονής, όπως κυτταρικοί μηνοειδείς σχηματισμοί και σοβαρή διάμεση φλεγμονή, παρά με στοιχεία ίνωσης. Σε αυτό το εκφραστικό πρότυπο φαίνεται ότι η φλεγμονή κυριαρχεί έναντι της ίνωσης, όπως και ότι επαναφέροντας την ισορροπία στο μονοπάτι TGF-β1/pSmad3/Smad7 ίσως προσφέρει αποτελεσματικό θεραπευτικό στόχο έναντι της φλεγμονής στη ΣΝ. Εκτός αυτού, το παραπάνω εκφραστικό πρότυπο σχετίζεται επίσης με χαμηλότερα επίπεδα στον ορό C3 και C4, αναδεικνύοντας ένα διασταυρούμενο μονοπάτι μεταξύ των TGF-β1/Smad και του καταρράκτη του συμπληρώματος, όταν η φλεγμονή κυριαρχεί. Πρόσφατες μελέτες αναφέρονται σε νέους μηχανισμούς, με τους οποίους ο TGF-β1 μπορεί να προάγει νεφρική βλάβη, όπως είναι η χημειοταξία των μακροφάγων [271]. Οι πρωτεΐνες του καταρράκτη του συμπληρώματος προκαλούν πόλωση των μακροφάγων, αλλά η αλληλεπίδραση των επιπέδων του συμπληρώματος στον ορό με τις πρωτεΐνες του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF-β1/Smad στη νεφρική βλάβη δεν έχει διερευνηθεί. Επομένως, τα ευρήματα αυτά μας επισημαίνουν μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ του TGF-β1/Smad μονοπατιού και του καταρράκτη του συμπληρώματος, η οποία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

## 9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη σε ανθρώπινο ιστό όχι μόνο επιβεβαίωσε προηγούμενες αναφορές ότι η έκφραση του TGF-β1 σχετίζεται με τη νεφρική ίνωση και τη σπειραματοσκλήρυνση, αλλά επιπλέον καθορίστηκε ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για εξέλιξη στη ΧΝΝ στις σπειραματικές παθήσεις. Τα οφέλη της παρούσας μελέτης στοχεύουν στα εξής:

### 1) Πρόγνωση

Η νεφρική ίνωση αποτελεί κοινό παθογενετικό τελικό σημείο στη χρόνια νεφρική νόσο και τον καλύτερο προγνωστικό δείκτη. Αποτελεί όμως μια δυναμική διαδικασία και ξεκινάει μαζί με την έναρξη του εκλυτικού παράγοντα και της φλεγμονής στο νεφρό, όπου υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των ενδογενών νεφρικών και των φλεγμονωδών κυττάρων και στο τέλος όλα τα διαμερίσματα του νεφρού επηρεάζονται, ανεξαρτήτως εάν η βλάβη ξεκινήσει στο σπείραμα. Μέχρις στιγμής, αρκετοί βιοδείκτες (ούρα, αίμα) έχουν χρησιμοποιηθεί, συχνά όμως αντικατροπτίζουν μόνο την έκταση της πρωτεϊνουρίας, και ενδεικτικά δείχνουν τη συνολική λειτουργία του νεφρού, ενώ δεν μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την έκταση, την κατανομή ή την εξέλιξη της ίνωσης. Από την άλλη οι ιστολογικοί προγνωστικοί δείκτες (σπειραματοσκλήρυνση, διάμεση ίνωση, σωληναριακή ατροφία, περιαγγειακή ίνωση) που χρησιμοποιούνται αντικατροπτίζουν την ποσότητα του κολλαγόνου τη δεδομένη στιγμή. Επομένως, εικάζουμε ότι η ανασοϊστοχημική μελέτη του TGF-β1/Smad μονοπατιού στις σπειραματικές παθήσεις θα μπορούσε να φανεί χρήσιμο εργαλείο στη νεφρική βιοψία, ώστε να εξάγει κανείς προγνωστικά στοιχεία για τη νεφρική εξέλιξη και να σχεδιάσει την ιδεατή θεραπευτική στρατηγική, καθώς όπως είδαμε εκφράζονται και σε περιοχές φλεγμονής (διάμεση φλεγμονή, μηννοειδείς σχηματισμοί), αποτελώντας πιο πρώιμους προγνωστικούς δείκτες της νεφρικής ίνωσης/εξέλιξης και επομένως προσφέροντας επιπλέον δεδομένα για την εξέλιξη της ίνωσης σε πιο αρχικό στάδιο.



## 2) Θεραπεία

Αν και το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β1/Smad φαίνεται να εκφράζεται σε όλες τις πειραματικές παθήσεις, η ένταση, η έκταση και η εντόπιση της έκφρασης διαφέρει όπως είδαμε, με χαρακτηριστικά σημεία στις υποκατηγορίες που μελετήθηκαν, δίνοντας βήμα για περαιτέρω διερεύνηση και συσχέτιση με τους παθογενετικούς μηχανισμούς ξεχωριστά στην καθεμία. Η αναλυτική διερεύνηση του σηματοδοτικού μονοπατιού αποσκοπεί στην αναζήτηση αποτελεσματικών θεραπευτικών στόχων, καθώς η εξισορρόπηση της σχέσης των παραπάνω πρωτεϊνών αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο στόχο έναντι της νεφρικής ίνωσης σε σχέση με την άμεση αναστολή του TGF-β1, η οποία δεν έχει επιφέρει τα προσδοκώμενα αποτελέσματα. Επομένως, εικάζουμε ότι η ανοσοϊστοχημική ανάλυση του TGF-β1/Smad μονοπατιού στις πειραματικές παθήσεις εξάγει σημαντικές πληροφορίες για τους παθογενετικούς μηχανισμούς της ιστικής βλάβης αποσκοπώντας στην αναζήτηση νέων θεραπευτικών στόχων.

## 3) Ερευνητικές Προτάσεις

Η κατανόηση της μηχανισμών παθογένειας της ιστικής βλάβης στις πειραματικές παθήσεις συνεχώς βελτιώνεται κυρίως όμως από προ-κλινικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα. Επομένως, απαιτούνται περισσότερες ερευνητικές μελέτες, κυρίως σε ανθρώπινο ιστό, ώστε να γίνουν περαιτέρω κατανοητοί αυτοί οι μηχανισμοί, για να επιβεβαιώσουν καθώς και να διευρύνουν περαιτέρω και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Ενδιαφέρον ερευνητικό πεδίο αποτελεί και η αλληλεπίδραση του TGF-β1/Smad μονοπατιού με άλλα σχετιζόμενα με τη νεφρική βλάβη σηματοδοτικά μονοπάτια (όπως Wnt/β-catenin, klotho/FGF23, YAP/TAZ), καθώς και η συσχέτιση του με την ειδική (T-cells, B-cells) και τη μη ειδική ανοσία (μακροφάγα, δενδριτικά, ουδετερόφιλα, συμπλήρωμα) στη νεφρική νόσο. Τέλος, περαιτέρω έλεγχος και συσχετισμούς σε μεγαλύτερο αριθμό βιοψιών ξεχωριστά σε κάθε υπότυπο από τις πειραματικές παθήσεις που εξετάσαμε, ώστε να καταγραφούν πιο στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα ξεχωριστά σε κάθε υποκατηγορία, αποσκοπώντας σε πιθανή εφαρμογή των αποτελεσμάτων σε προγνωστικά ιστολογικά score, ειδικά στις υπερπλαστικές μορφές (NL, AAV) που φάνηκε το μονοπάτι να είναι πιο έντονα ενεργοποιημένο.

## 10. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΛΗΡΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ (καταχωρημένα στο Pubmed)

- 1) **Chalkia A**, Gakiopoulou H, Theohari I, Foukas PG, Vassilopoulos D, Petras D. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1/Smad Signaling in Glomerulonephritis and Its Association with Progression to Chronic Kidney Disease. **Am J Nephrol.** 2021 Sep 8:1-13
- 2) **Chalkia A**, Gakiopoulou H, Theohari I, Foukas PG, Vassilopoulos D, Petras D. TGF- $\beta$ 1/Smad signaling in proliferative glomerulonephritis associated with autoimmune diseases. **MJR** 2021 (accepted for publication)

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΜΕ ΤΗ ΜΟΡΦΗ ΠΕΡΙΛΗΨΕΩΝ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- 3) **Chalkia A**, Gakiopoulou H, Giannou P, Alexakou Z, Kapota A, Kourniotis D, Petras D. TGF- $\beta$ 1/Smad signaling in glomerulonephritis and its association with progression to chronic kidney disease. **JASN Kidney Week Abstracts 2021**

### ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 4) **Chalkia A**, Gakiopoulou H, Giannou P, Alexakou Z, Kapota A, Kourniotis D, Petras D. TGF- $\beta$ 1/Smad signaling in glomerulonephritis and its association with progression to chronic kidney disease. **ASN Kidney Week Nov 4-7, 2021**

### ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 5) **Χαλκιά Α**, Γακιοπούλου Χ, Κουρνιώτης Δ, Αλεξάκου Ζ, Βασιλόπουλος Δ, Πετράς Δ. Το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF/Smad στην ANCA σχετιζόμενη σπειραματονεφρίτιδα. 7<sup>η</sup> Δημερίδα με Θέμα: Αγγειίτιδες, Αθήνα Σεπ 24-25, 2021

## 11. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ

### Εισαγωγή

Ο αυξητικός μετατρεπτικός παράγοντας  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) αποτελεί μία πλειοτροπική κυτοκίνη, με διαφορετικούς ρόλους στην ίνωση και τη φλεγμονή, και δρα μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Smad στη νεφρική παθολογία. Στη παρούσα μελέτη αποσκοπούμε στην καταγραφή της έκφρασης του TGF- $\beta$ 1/Smad μονοπατιού στη σπειραματονεφρίτιδα (ΣΝ) και στην αξιολόγηση ως προγνωστικό δείκτη στην εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής νόσου (ΧΝΝ).

### Μέθοδοι

Αξιολογήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση των TGF- $\beta$ 1, φωσφορυλιωμένη Smad3 (pSmad3) και Smad7 ημιποσοτικά και ποσοτικά, χρησιμοποιώντας ψηφιακή μέθοδο ανάλυσης και επεξεργασίας εικόνας σε διάφορα τμήματα από 50 νεφρικές βιοψίες από ΣΝ και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με στατιστική ανάλυση με βάση κλινικο-ιστολογικές παραμέτρους. Επιπλέον, εξετάσαμε τη σχέση μεταξύ των εκφράσεων, την επίδραση της ταυτόχρονης έκφρασης και το ρόλο ως προς την εξέλιξη της ΧΝΝ.

### Αποτελέσματα

Η έκφραση του TGF- $\beta$ 1 σχετίστηκε θετικά με τη τμηματική σπειραματοκλήρυνση ( $p=0.025$ ) και το επίπεδο της κρεατινίνης στη διάγνωση ( $p=0.002$ ), ενώ η έκφραση pSmad3 με τη διάμεση φλεγμονή ( $p=0.024$ ). Στο πείραμα, η ταυτόχρονη έκφραση έντονης Smad7 και μέτριας pSmad3 παρατηρήθηκε να σχετίζεται με τη νεφρική φλεγμονή, όπως οι κυτταρικοί μηνοειδείς ( $p=0.011$ ), έντονη διάμεση φλεγμονή ( $p=0.029$ ) και χαμηλά επίπεδα συμπληρώματος ορού 3 ( $p=0.028$ ) και συμπληρώματος 4 ( $p=0.029$ ). Επίσης, καταγράψαμε μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της pSmad3 έκφρασης στα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα της υπερπλαστικής ΣΝ ( $p=0.045$ ) και στα ποδοκύτταρα της μη-υπερπλαστικής ΣΝ ( $p=0.005$ ). Τέλος, στο πολλαπλό μοντέλο

αναλογικών κινδύνων Cox η έκφραση TGF-β1 (**HR= 6.078; 95%CI 1.168-31.627; p=0.032**) αναδείχθηκε ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για εξέλιξη στη ΧΝΝ.

### **Συμπεράσματα**

Το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β1/Smad είναι ενεργοποιημένο στη ΣΝ με ειδικά χαρακτηριστικά στις διάφορες μορφές σπειραματικής βλάβης. Η έκφραση του TGF-β1 αναδεικνύεται ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για εξέλιξη στη ΧΝΝ στη ΣΝ, ενώ ξεχωριστό εκφραστικό πρότυπο των pSmad3 και Smad7 στο σπείραμα φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με τη νεφρική φλεγμονή.

## 12. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΕ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ

### Introduction

Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) is a multifunctional cytokine, with diverse roles in fibrosis and inflammation, which acts through Smad signaling in renal pathology. We intended to investigate the expression of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling in glomerulonephritis (GN) and to assess its role as risk factor for progression to chronic kidney disease (CKD).

### Methods

We evaluated the immunohistochemical expression of TGF- $\beta$ 1, phosphorylated Smad3 (pSmad3) and Smad7 semi-quantitatively and quantitatively using computerized image analysis program in different compartments of 50 renal biopsies with GN and the results were statistically analyzed with clinicopathological parameters. We also examined the associations among their expressions, the impact of their co-expression, and their role in progression to CKD.

### Results

TGF- $\beta$ 1 expression correlated positively with segmental glomerulosclerosis (**p=0.025**) and creatinine level at diagnosis (**p=0.002**), while pSmad3 expression with interstitial inflammation (**p=0.024**). In glomerulus, concomitant expressions of high Smad7 and medium pSmad3 were observed to be correlated with renal inflammation, such as cellular crescent (**p=0.011**), intense interstitial inflammation (**p=0.029**) and lower serum complement 3 (**p=0.028**) and complement 4 (**p=0.029**). We also reported a significant association between pSmad3 expression in glomerular endothelial cells of proliferative GN (**p=0.045**) and in podocytes of non-proliferative GN (**p=0.005**). Finally, on multivariate Cox-regression analysis, TGF- $\beta$ 1 expression (**HR= 6.078; 95%CI 1.168-31.627; p=0.032**) was emerged as independent predictor for progression to CKD.

## **Discussion/Conclusion**

TGF- $\beta$ 1/Smad signaling is upregulated with specific characteristics in different forms of GN. TGF- $\beta$ 1 expression is indicated as independent risk factor for progression to CKD, while specific co-expression pattern of pSmad3 and Smad7 in glomerulus is correlated with renal inflammation.

### 13. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAV	ANCA σχετιζόμενη αγγειίτιδα
AGEs	Advanced glycation end products
ANCA	antineutrophil cytoplasmic antibodies
Angpt14	angiopoietin-like 4
anti-dsDNA	αντισώματα εναντίον της έλικας του DNA
anti-GBM	αντισώματα έναντι της βασικής μεμβράνης του σπειράματος
anti-PLA2R	αντισώματα έναντι του υποδοχέα της φωσφολιπάσης 2
AΦ	ανοσοφθορισμός
BAFF	B-cell activating factor
BMPs	Bone morphogenetic proteins
C3	complement component 3
C4	complement component 4
C4d	complement component 4d
C5a	Complement component 5a
C5b-9	σύμπλεγμα που προσβάλλει τη μεμβράνη
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CCR5	C-C chemokine receptor type 5
CI	confidence interval
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CFI	complement factor I
CFH	complement factor H gene
CTGF	Connective tissue growth factor
eGFR	estimated glomerular filtration rate
EMT	μεσεγχυματική μετατροπή κυττάρων
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ΕΤΣΣ	Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση
Foxp3+	Forkhead Box P3
HR	hazard ratio
IgAN	IgA νεφροπάθεια
IgG	Immunoglobulin G
IL-17	Interleukin 17
ISN/RPS	International Society of Nephrology and the Renal Pathology Society
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
KDIGO	The Kidney Disease: Improving Global Outcomes
LAP	latency associated peptide
LPS	λιποπολυσακχαρίτη
LTBP	Latent TGF-β-binding protein
MBL	Mannose-binding lectin

MCP1	χημειοτακτική πρωτεΐνη των μακροφάγων
MIF	ανασταλτικός παράγοντας των μακροφάγων
MIP-1-alpha	φλεγμονώδης πρωτεΐνη 1-α των πρωτεϊνών
MMPs	matrix metalloproteinases
MN	Μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια
MPO	αντισώματα έναντι της μυελοϋπεροξειδάσης
ΜΣΑΦ	μη στερεοειδή αντιφλεγμονώδη
NCL	non-collagenous domain
NEA	Νόσος Ελαχίστων Αλλοιώσεων
NELL1	neural epidermal growth factor-like 1
NEP	ουδέτερη ενδοπεπτιδάση
ΝΑ	Νεφρίτιδα του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells
PAS	αντίδραση περιοδικού οξέος κατα Schiff
PDGF	αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων
PECs	τοιχωματικά επιθηλιακά κύτταρα
PR3	αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης 3
pSmad3	phosphorylated Smad3
ROS	reactive oxygen species
ΣΒΜ	σπειραματική βασική μεμβράνη
SLC	small latent complex
ΣΝ	σπειραματονεφρίτιδα
SuPAR	soluble urokinase Plasminogen Activator Receptor
TβRI	TGF-β type I receptor
TβRII	TGF-β type II receptor
ΤΕΣΝ	ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
TGF-β2	Transforming growth factor beta 2
TGF-β3	Transforming growth factor beta 3
Th1	T helper cell 1
Th2	T helper cell 2
Th17	T helper 17
THSD7A	θρομβοσπονδίνη -1
TIMP	ιστικός αναστολέας
TLR9	toll-like receptor 9
TNF	παράγοντας νέκρωσης όγκων
Treg	regulatory T cells
VEGF	vascular endothelial growth factor
XNN	χρόνια νεφρική νόσος
XNNTΣ	χρόνια νεφρική νόσος τελικού σταδίου



## 14.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Floege J., Johnson R. Feehally J. 2010 Comprehensive Clinical Nephrology fourth edition. Elsevier, Missouri 1312 pp
2. Kriz W, Kaissling B. Structural organization of the mammalian kidney. In: Seldin D, Giebisch G, eds. The kidney. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000:587-654
3. Kriz W, Bankir L. A standard nomenclature for structure of the kidney. The renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). Pflugers Arch 1988; 411:113-120
4. Elger M, Sakai T, Kriz W. The vascular pole of the renal glomerulus of rat. Adv Anat Embryol Cell Biol.1998; 139:1-98
5. Rostgaard J, Qvortrup K. Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. Microvasc Res.1997; 53:1-13.
6. Inoue S. Ultrastructural architecture of basement membranes. Contrib Nephrol.1994;107:21-28
7. Neal CR, Crook H, Bell E, et al. Three-dimensional reconstruction of glomeruli by electron microscopy reveals a distinctive restrictive urinary subpodocyte space. J Am Soc Nephrol. 2005; 16:1223-1235
8. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. Physiol Rev. 2003; 83:253-307
9. Maunsbach A. Functional ultrastructure of the proximal tubule. In: Windhager E, ed. Handbook of Physiology: Secretion on Renal Physiology. New York: Oxford University Press; 1992:41-108
10. Madsen KM, Tisher CC. Structural- functional relationships along the distal nephron. Am J Physiol 1986; 250: F1
11. Kaissling B, Hegyi I, Loffing J, Le Hir M. Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. Anat Embryol. 1996; 193:303-318
12. Rose B A, Post T W. 2001. Clinical Physiology of Acid-Base and electrolyte Disorders. Fifth edition. McGraw-Hill Medical, New York 1008pp
13. Kriz W, Elger M, Mundel P, Lemley K. Structure-stabilizing forces in the glomerular tuft. J Am Soc Nephrol. 1995; 5:1731-1739
14. Drumond M, Deen W. Structural determinants of glomerular hydraulic permeability. Am J physiol. 1994; 266:F1-F12
15. Weening J, Jennette JC. Historical milestones in renal pathology. Virchows Arch 2012; 461:3
16. J. Charles Jennette MD, Vivette D. D'Agati MD, Jean L. Olson MD, Fred G. Silva MD. 2014. Heptinstall's Pathology of the Kidney. Lippincott Williams & Wilkins.
17. Vivarelli M, Massella L, Ruggiero B, Emma F. Minimal Change Disease. Clin J Am Soc Nephrol 2017; 12:332
18. Waldman M, Crew RJ, Valeri A, et al. Adult minimal-change disease: clinical characteristics, treatment, and outcomes. Clin J Am Soc Nephrol 2007; 2:445.

19. Schnaper HW, Robson AA, Kopp JB. Nephrotic syndrome: Minimal change nephropathy, focal segmental glomerulosclerosis, and collapsing glomerulopathy. In: Diseases of the Kidney and Urinary Tract, 8th ed, Schrier RW (Ed), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2007. P.1585.
20. Tune BM, Mendoza SA. Treatment of the idiopathic nephrotic syndrome: regimens and outcomes in children and adults. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:824.
21. Nakayama M, Katafuchi R, Yanase T, et al. Steroid responsiveness and frequency of relapse in adult-onset minimal change nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:503.
22. Debiec H, Ronco P. Immunopathogenesis of membranous nephropathy: an update. *Semin Immunopathol* 2014; 36:381.
23. Jennette JC, Iskandar SS, Dalldorf FG. Pathologic differentiation between lupus and nonlupus membranous glomerulopathy. *Kidney Int* 1983; 24:377.
24. Wasserstein AG. Membranous glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:664.
25. Fogo AB, Lusco MA, Najafian B, Alpers CE. *AJKD Atlas of Renal Pathology: Membranous Nephropathy*. *Am J Kidney Dis* 2015; 66:e15.
26. Ponticelli C, Zucchelli P, Passerini P, et al. A 10-year follow-up of a randomized study with methylprednisolone and chlorambucil in membranous nephropathy. *Kidney Int* 1995; 48:1600.
27. Shiiki H, Saito T, Nishitani Y, et al. Prognosis and risk factors for idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome in Japan. *Kidney Int* 2004; 65:1400.
28. Glassock RJ. Diagnosis and natural course of membranous nephropathy. *Semin Nephrol* 2003; 23:324.
29. Haas M, Meehan SM, Karrison TG, Spargo BH. Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *Am J Kidney Dis* 1997; 30:621.
30. Chun MJ, Korbet SM, Schwartz MM, Lewis EJ. Focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic adults: presentation, prognosis, and response to therapy of the histologic variants. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:2169.
31. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis* 2004; 43:368.
32. Rydel JJ, Korbet SM, Borok RZ, Schwartz MM. Focal segmental glomerular sclerosis in adults: presentation, course, and response to treatment. *Am J Kidney Dis* 1995; 25:534.
33. Wehrmann M, Bohle A, Held H, et al. Long-term prognosis of focal sclerosing glomerulonephritis. An analysis of 250 cases with particular regard to tubulointerstitial changes. *Clin Nephrol* 1990; 33:115.
34. Chitalia VC, Wells JE, Robson RA, et al. Predicting renal survival in primary focal glomerulosclerosis from the time of presentation. *Kidney Int* 1999; 56:2236.
35. Li LS, Liu ZH. Epidemiologic data of renal diseases from a single unit in China: analysis based on 13,519 renal biopsies. *Kidney Int* 2004; 66:920.
36. Donadio JV, Grande JP. IgA nephropathy. *N Engl J Med* 2002; 347:738.

37. Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society, Cattran DC, Coppo R, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney Int* 2009; 76:534.
38. Barbour SJ, Espino-Hernandez G, Reich HN, et al. The MEST score provides earlier risk prediction in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2016; 89:167.
39. Alamartine E, Sabatier JC, Guerin C, et al. Prognostic factors in mesangial IgA glomerulonephritis: an extensive study with univariate and multivariate analyses. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:12.
40. Sethi S, Fervenza FC. Membranoproliferative glomerulonephritis--a new look at an old entity. *N Engl J Med* 2012; 366:1119.
41. Bennett WM, Fassett RG, Walker RG, et al. Mesangiocapillary glomerulonephritis type II (dense-deposit disease): clinical features of progressive disease. *Am J Kidney Dis* 1989; 13:469.
42. Cameron JS, Turner DR, Heaton J, et al. Idiopathic mesangiocapillary glomerulonephritis. Comparison of types I and II in children and adults and long-term prognosis. *Am J Med* 1983; 74:175.
43. Almaani S, Meara A, Rovin BH. Update on Lupus Nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; 12:825.
44. Markowitz GS, D'Agati VD. The ISN/RPS 2003 classification of lupus nephritis: an assessment at 3 years. *Kidney Int* 2007; 71:491.
45. Austin HA 3rd, Boumpas DT, Vaughan EM, Balow JE. Predicting renal outcomes in severe lupus nephritis: contributions of clinical and histologic data. *Kidney Int* 1994; 45:544.
46. Contreras G, Pardo V, Cely C, et al. Factors associated with poor outcomes in patients with lupus nephritis. *Lupus* 2005; 14:890.
47. Falk RJ, Hogan S, Carey TS, Jennette JC. Clinical course of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and systemic vasculitis. The Glomerular Disease Collaborative Network. *Ann Intern Med* 1990; 113:656.
48. Hauer HA, Bajema IM, van Houwelingen HC, et al. Renal histology in ANCA-associated vasculitis: differences between diagnostic and serologic subgroups. *Kidney Int* 2002; 61:80.
49. Berden AE, Ferrario F, Hagen EC, et al. Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:1628.
50. Robson J, Doll H, Suppiah R, et al. Damage in the anca-associated vasculitides: long-term data from the European vasculitis study group (EUVAS) therapeutic trials. *Ann Rheum Dis* 2015; 74:177.
51. Rhee RL, Hogan SL, Poulton CJ, et al. Trends in Long-Term Outcomes Among Patients With Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis With Renal Disease. *Arthritis Rheumatol* 2016; 68:1711.
52. Couser WG. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23:381.
53. Anders HJ, Fogo AB. Immunopathology of lupus nephritis. *Semin Immunopathol* 2014; 36:443.

54. Hudson BG. The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:2514.
55. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 2003; 348:2543.
56. Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009; 361:11.
57. Tomas NM, Beck LH Jr, Meyer-Schwesinger C, et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2014; 371:2277.
58. Kalaaji M, Fenton KA, Mortensen ES, et al. Glomerular apoptotic nucleosomes are central target structures for nephritogenic antibodies in human SLE nephritis. *Kidney Int* 2007; 71:664.
59. Tomana M, Novak J, Julian BA, et al. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest* 1999; 104:73
60. Debiec H, Lefeu F, Kemper MJ, et al. Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin. *N Engl J Med* 2011; 364:2101.
61. Gupta A, Quigg RJ. Glomerular Diseases Associated With Hepatitis B and C. *Adv Chronic Kidney Dis* 2015; 22:343.
62. Cui Z, Zhao MH, Segelmark M, Hellmark T. Natural autoantibodies to myeloperoxidase, proteinase 3, and the glomerular basement membrane are present in normal individuals. *Kidney Int* 2010; 78:590.
63. Guerry MJ, Vanhille P, Ronco P, Debiec H. Serum anti-PLA2R antibodies may be present before clinical manifestations of membranous nephropathy. *Kidney Int* 2016; 89:1399.
64. Kitching AR, Hutton HL. The Players: Cells Involved in Glomerular Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; 11:1664.
65. Nangaku M, Couser WG. Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury. *Clin Exp Nephrol* 2005; 9:183.
66. Vivarelli M, Emma F, Pellé T, et al. Genetic homogeneity but IgG subclass-dependent clinical variability of alloimmune membranous nephropathy with anti-neutral endopeptidase antibodies. *Kidney Int* 2015; 87:602.
67. Hénique C, Papista C, Guyonnet L, et al. Update on crescentic glomerulonephritis. *Semin Immunopathol* 2014; 36:479.
68. Tipping PG, Holdsworth SR. Cytokines in glomerulonephritis. *Semin Nephrol* 2007; 27:275.
69. Segerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:152.
70. Chung AC, Lan HY. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22:802.
71. Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, et al. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:289.
72. Jayne DRW, Bruchfeld AN, Harper L, et al. Randomized Trial of C5a Receptor Inhibitor Avacopan in ANCA-Associated Vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28:2756.

73. Naik A, Sharma S, Quigg RJ. Complement regulation in renal disease models. *Semin Nephrol* 2013; 33:575.
74. Ma R, Cui Z, Hu SY, et al. The alternative pathway of complement activation may be involved in the renal damage of human anti-glomerular basement membrane disease. *PLoS One* 2014; 9:e91250.
75. Pickering MC, D'Agati VD, Nester CM, et al. C3 glomerulopathy: consensus report. *Kidney Int* 2013; 84:1079.
76. Wang X, Van Lookeren Campagne M, Katschke KJ Jr, et al. Prevention of Fatal C3 Glomerulopathy by Recombinant Complement Receptor of the Ig Superfamily. *J Am Soc Nephrol* 2018; 29:2053
77. Lan HY. Role of macrophage migration inhibition factor in kidney disease. *Nephron Exp Nephrol* 2008; 109:e79.
78. Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, et al. Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2555.
79. Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, et al. RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 1997; 185:1371.
80. Segerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:152.
81. De Vriese AS, Endlich K, Elger M, et al. The role of selectins in glomerular leukocyte recruitment in rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2510.
82. Devi S, Li A, Westhorpe CL, et al. Multiphoton imaging reveals a new leukocyte recruitment paradigm in the glomerulus. *Nat Med* 2013; 19:107.
83. Summers SA, Steinmetz OM, Ooi JD, et al. Toll-like receptor 9 enhances nephritogenic immunity and glomerular leukocyte recruitment, exacerbating experimental crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2010; 177:2234.
84. Summers SA, van der Veen BS, O'Sullivan KM, et al. Intrinsic renal cell and leukocyte-derived TLR4 aggravate experimental anti-MPO glomerulonephritis. *Kidney Int* 2010; 78:1263.
85. Ito I, Yuzawa Y, Mizuno M, et al. Effects of a new synthetic selectin blocker in an acute rat thrombotic glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 2001; 38:265.
86. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009; 15:623.
87. Rastaldi MP, Ferrario F, Crippa A, et al. Glomerular monocyte-macrophage features in ANCA-positive renal vasculitis and cryoglobulinemic nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:2036.
88. Timoshanko JR, Kitching AR, Semple TJ, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression by both renal parenchymal and immune cells mediates murine crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2646.

89. Kluger MA, Zahner G, Paust HJ, et al. Leukocyte-derived MMP9 is crucial for the recruitment of proinflammatory macrophages in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 2013; 83:865.
90. Huang J, Filipe A, Rahuel C, et al. Lutheran/basal cell adhesion molecule accelerates progression of crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int* 2014; 85:1123.
91. Yang N, Nikolic-Paterson DJ, Ng YY, et al. Reversal of established rat crescentic glomerulonephritis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF): potential role of MIF in regulating glucocorticoid production. *Mol Med* 1998; 4:413.
92. Koyama A, Fujisaki M, Kobayashi M, et al. A glomerular permeability factor produced by human T cell hybridomas. *Kidney Int* 1991; 40:453
93. Ooi JD, Kitching AR, Holdsworth SR. Review: T helper 17 cells: their role in glomerulonephritis. *Nephrology (Carlton)* 2010; 15:513.
94. Camussi G, Tetta C, Coda R, et al. Platelet-activating factor-induced loss of glomerular anionic charges. *Kidney Int* 1984; 25:73.
95. Sacks S, Zhou W. New boundaries for complement in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:1865.
96. Ostendorf T, Kunter U, van Roeyen C, et al. The effects of platelet-derived growth factor antagonism in experimental glomerulonephritis are independent of the transforming growth factor-beta system. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:658.
97. Eng E, Holgren C, Hubchak S, et al. Hypoxia regulates PDGF-B interactions between glomerular capillary endothelial and mesangial cells. *Kidney Int* 2005; 68:695.
98. Berthelot L, Papista C, Maciel TT, et al. Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J Exp Med* 2012; 209:793
99. Rabelink TJ, de Boer HC, van Zonneveld AJ. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6:404.
100. Kang DH, Kanellis J, Hugo C, et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:806.
101. Moeller MJ, Soofi A, Hartmann I, et al. Podocytes populate cellular crescents in a murine model of inflammatory glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:61.
102. Thorner PS, Ho M, Eremina V, et al. Podocytes contribute to the formation of glomerular crescents. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:495.
103. Henique C, Bollée G, Loyer X, et al. Genetic and pharmacological inhibition of microRNA-92a maintains podocyte cell cycle quiescence and limits crescentic glomerulonephritis. *Nat Commun* 2017; 8:1829.
104. McCarthy ET, Sharma M, Savin VJ. Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5:2115.
105. Maas RJ, Deegens JK, Wetzels JF. Permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome: historical perspectives and lessons for the future. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29:2207.
106. Davin JC. The glomerular permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2016; 31:207.

107. Hoyer JR, Vernier RL, Najarian JS, et al. Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation. *Lancet* 1972; 2:343.
108. Cattran D, Neogi T, Sharma R, et al. Serial estimates of serum permeability activity and clinical correlates in patients with native kidney focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:448.
109. Gallon L, Leventhal J, Skaro A, et al. Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after retransplantation. *N Engl J Med* 2012; 366:1648.
110. Kemper MJ, Wolf G, Müller-Wiefel DE. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med* 2001; 344:386.
111. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:2063.
112. Glassock RJ. Circulating permeability factors in the nephrotic syndrome: a fresh look at an old problem. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:541.
113. Liu G, Kaw B, Kurfis J, et al. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* 2003; 112:209.
114. Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int* 2005; 67:404.
115. Wei C, El Hindi S, Li J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med* 2011; 17:952.
116. Clement LC, Avila-Casado C, Macé C, et al. Podocyte-secreted angiopoietin-like-4 mediates proteinuria in glucocorticoid-sensitive nephrotic syndrome. *Nat Med* 2011; 17:117
117. Chugh SS, Clement LC, Macé C. New insights into human minimal change disease: lessons from animal models. *Am J Kidney Dis* 2012; 59:284
118. Wei C, Trachtman H, Li J, et al. Circulating suPAR in two cohorts of primary FSGS. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23:2051
119. Huang J, Liu G, Zhang YM, et al. Plasma soluble urokinase receptor levels are increased but do not distinguish primary from secondary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2013; 84:366.
120. Cathelin D, Placier S, Ploug M, et al. Administration of recombinant soluble urokinase receptor per se is not sufficient to induce podocyte alterations and proteinuria in mice. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25:1662.
121. Ishimoto T, Shimada M, Araya CE, et al. Minimal change disease: a CD80 podocytopathy? *Semin Nephrol* 2011; 31:320.
122. Nangaku M, Shankland SJ, Couser WG. Cellular response to injury in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1195.
123. Cunningham PN, Quigg RJ. Contrasting roles of complement activation and its regulation in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1214.
124. Ma H, Sandor DG, Beck LH Jr. The role of complement in membranous nephropathy. *Semin Nephrol* 2013; 33:531.

125. Farquhar MG, Saito A, Kerjaschki D, Orlando RA. The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6:35.
126. Debiec H, Guignon V, Mougnot B, et al. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med* 2002; 346:2053.
127. Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009; 361:11.
128. Tomas NM, Beck LH Jr, Meyer-Schwesinger C, et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2014; 371:2277.
129. Gödel M, Grahammer F, Huber TB. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2015; 372:1073.
130. Sethi S, Debiec H, Madden B, et al. Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy. *Kidney Int* 2020; 97:163.
131. Ronco P, Debiec H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care. *Lancet* 2015; 385:1983.
132. Kerjaschki D, Schulze M, Binder S, et al. Transcellular transport and membrane insertion of the C5b-9 membrane attack complex of complement by glomerular epithelial cells in experimental membranous nephropathy. *J Immunol* 1989; 143:546.
133. Schulze M, Donadio JV Jr, Pruchno CJ, et al. Elevated urinary excretion of the C5b-9 complex in membranous nephropathy. *Kidney Int* 1991; 40:533.
134. Kon SP, Coupes B, Short CD, et al. Urinary C5b-9 excretion and clinical course in idiopathic human membranous nephropathy. *Kidney Int* 1995; 48:1953.
135. Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:3005.
136. Yuan H, Takeuchi E, Taylor GA, et al. Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:946.
137. Y. Shi, J. Massague, Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell* 113 (2003) 685–700.
138. C.H. Heldin, A. Moustakas, Role of Smads in TGF $\beta$  signaling, *Cell Tissue Res.* 347 (2012) 21–36.
139. De Boeck M, Ten Dijke P, Key role for ubiquitin protein modification in TGF $\beta$  signal transduction. *Ups J Med Sci.* 2012 May; 117(2): 153–165.
140. Romeo DS, Park K, Roberts AB, Sporn MB, Kim SJ. An element of the transforming growth factor-beta 1 5'-untranslated region represses translation and specifically binds a cytosolic factor. *Mol Endocrinol* 1993; 7:759–766
141. Budi EH, Duan D and Derynck R. Transforming growth factor- $\beta$  receptors and Smads: regulatory complexity and functional versatility. *Trends Cell Biol* 2017; 27:658–672
142. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, et al. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 1996;49(2):461-9.
143. Ito Y, Goldschmeding R, Kasuga H, Claessen N, Nakayama M, Yuzawa Y, Sawai A, Matsuo S, Weening JJ, Aten J. Expression patterns of connective tissue growth factor and of TGF-



- $\beta$  isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: F545–F558
144. Tampe, B, Zeisberg, M. Evidence for the involvement of epigenetics in the progression of renal fibrogenesis. *Nephrol. Dial. Transplant* 2014; 29 (Suppl. 1), i1–i8
  145. Nikolic-Paterson DJ, Wang S, Lan HY. Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms. *Kidney Int. Suppl* 2011; 4, 34–38
  146. Massague J., Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000; 19, 1745–1754.
  147. Wang W, Huang XR, Li AG, et al. Signaling mechanism of TGF- $\beta$ 1 in prevention of renal inflammation: role of Smad7, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16: 1371–1383.
  148. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24(2-3):111-9.
  149. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 1988;106(5):1659-65.
  150. Wrana JL, Attisano L. The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11(1-2)
  151. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGFbeta family signalling. *Nature* 2003;425(6958):577-84.
  152. Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, Susztak K, Bottinger EP. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling. *Kidney Int Suppl* 2000;77:S45-52
  153. Li Y, Kang YS, Dai C, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria, *Am J Pathol*, 2008, vol. 172 (pg. 299-308)
  154. Dennler S., Itoh S., Vivien D., Ten Dijke P., Huet S., Gauthier J. M. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* 1998 17, 3091–3100
  155. Massague J., Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000; 19, 1745–1754.
  156. Kassimatis T, Giannopoulou I, Koumoundourou D, Theodorakopoulou E, Varakis I, Nakopoulou L. Immunohistochemical evaluation of phosphorylated SMAD2/SMAD3 and the co-activator P300 in human glomerulonephritis: correlation with renal injury. *J Cell Mol Med.* 2006 Oct-Dec;10(4):908-21
  157. de Caestecker MP, Yahata T, Wang D, P et al. The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J Biol Chem.* 2000; 275: 2115–22
  158. Afrakhte M., Moren A., Jossan S., Itoh S., Sampath K., Westermarck B., et al. Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 249, 505–511.
  159. ] C.H. Heldin, A. Moustakas, Role of Smads in TGF $\beta$  signaling, *Cell Tissue Res.* 2012; 347: 21–36
  160. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *WIREs Developmental Biology* 2013; 2, 47-63

161. Soond SM, Chantry A. How ubiquitination regulates the TGF $\beta$  signaling pathway: New insights and new players. New isoforms of ubiquitin-activating enzymes in the E1-E3 families join the game. *Bioessays* 33, 2011; 749-758
162. Mavrakis KJ, Andrew RL, Lee KL, P et al. Arkadia enhances Nodal/TGF- $\beta$  signaling by coupling phospho-Smad2/3 activity and turnover. *Plos Biology* 2007; 5(3), e67
163. Kantharidis P., Wang B., Carew R. M., Lan H. Y. Diabetes complications: the microRNA perspective. *Diabetes* 2011; 60, 1832–1837
164. Kriegel A. J., Liu Y., Cohen B., Usa K., Liang M. MiR-382 targeting of kallikrein 5 contributes to renal inner medullary interstitial fibrosis. *Physiol. Genomics* 2012; 44, 259–267
165. Lan H. Y., Chung A. C. TGF- $\beta$ /Smad signaling in kidney disease. *Semin. Nephrol.* 2012; 32, 236–243
166. Loboda A, Sobczak M, Jozkowicz A, Dulak J. TGF- $\beta$ 1/Smads and miR-21 in Renal Fibrosis and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016;2016: 8319283
167. Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 731–740
168. Gewin L, Vadivelu S, Neelisetty S, et al. Deleting the TGF- $\beta$  receptor attenuates acute proximal tubule injury, *J. Am. Soc. Nephrol.*2012; 23: 2001–2011
169. Chung AC, Zhang H, Kong YZ, et al. Advanced glycation end-products induce tubular CTGF via TGF- $\beta$ -independent Smad3 signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21: 249–26
170. Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Al-Amin MA, et al. Fenofibrate attenuates diabetic nephropathy in experimental diabetic rat's model via suppression of augmented TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway, *Arch. Physiol. Biochem.* 2016: 122 :186–194
171. Zhou B, Mu J, Gong Y, Lu C, Zhao Y, He T, and Qin Z. Brd4 inhibition attenuates unilateral ureteral obstruction-induced fibrosis by blocking TGF- $\beta$ -mediated Nox4 expression, *Redox Biol.* 2017; 11: 390–402
172. Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton)* 2005;10(1):48-56
173. Liu Z, Huang XR, Chen HY, Fung E, Liu J, Lan HY. Deletion of angiotensin-converting enzyme-2 promotes hypertensive nephropathy by targeting Smad7 for ubiquitin degradation. *Hypertension* 2017; 70: 822–830
174. J B Kopp, V M Factor, M Mozes, et al. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 1996 Jun;74(6):991-1003.
175. Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* 2003 Nov;112(10):1486-94
176. Lyakh LA, Sanford M, Chekol S, Young HA, Roberts AB: TGF-beta and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells. *J Immunol* 2005; 174: 2061–2070
177. Letterio JJ and Roberts AB: Transforming growth factor-beta1- deficient mice: Identification of isoform-specific activities in vivo. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 769–774

178. Huang XR, Chung ACK, Zhou L, Wang XJ, and Lan HY. Latent TGF- $\beta$ 1 Protects Against Crescentic Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 233–242
179. Kitching AR and Holdsworth SR. The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(2):235
180. Xi Qiao, Padmashree Rao, Yun Zhang, et al. Redirecting TGF-  $\beta$  Signaling through the  $\beta$ -Catenin/Foxo Complex Prevents Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2018 Feb;29(2):557-570.
181. Ye M, Peng Y, Liu C, et al. Vibration induces BAFFoverexpression and aberrant O-Glycosylation of IgA1 in cultured humantonsillar mononuclear cells in IgA nephropathy. *Biomed Res Int.* (2016)2016:9125960.
182. Lanvin O, Guglielmi P, Fuentes V, et al. TGF-beta1 modulates Fas (APO-1/CD95)-mediated apoptosis of human pre-B cell lines. *Eur J Immunol.* (2003) 33:1372–81
183. Kim HA, Jeon SH, Seo GY, Park JB, Kim PH. TGF-beta1 and IFN-gamma stimulate mouse macrophages to express BAFF via different signaling pathways. *J Leukoc Biol.* 2008; 83:1431–9.
184. Eardley KS, Kubal C, Zehnder D, et al. The role of capillary density, macrophage infiltration and interstitial scarring in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Kidney Int* 2008 Aug;74(4):495-504
185. Zhang F, Wang H, Wang X, et al. TGF-beta induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget.* 2016;7(32):52294–306.
186. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11(11):723–37
187. Ai Z, Udalova IA. Transcriptional regulation of neutrophil differentiation and function during inflammation. *J Leukoc Biol.* 2020; 107:419–3
188. Zhang S. The role of transforming growth factor beta in T helper 17differentiation. *Immunology.* 2018; 155:24–35
189. Sierra-Mondragon E, Rodríguez-Muñoz R, Namorado-Tonix C, et al. All-Trans Retinoic Acid Attenuates Fibrotic Processes by Downregulating TGF- $\beta$ 1/Smad3 in Early Diabetic Nephropathy. *Biomolecules.* 2019;9(10):525
190. Zhang F, Wang C, Wen X et al. Mesenchymal stem cells alleviate rat diabetic nephropathy by suppressing CD103(+) DCs-mediated CD8(+) T cell responses. *J Cell Mol Med.* 2020; 24:5817–31
191. Kassianos AJ, Wang X, Sampangi S, et al. Fractalkine-CX3CR1-dependent recruitment and retention of humanCD1c+myeloid dendritic cells byin vitro-activated proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 2015; un;87(6):1153-63
192. López-Hernández FJ and López-Novoa JM. Role of TGF- $\beta$  in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 141–154
193. Wolf G, and Ziyadeh FN. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 1007; 106: p26–p31

194. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest* 2001; 108: 807–816
195. Ghayur A, Padwal MK, Liu L, Zhang J, and Margetts PJ. SMAD3-dependent and -independent pathways in glomerular injury associated with experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2019; 317: 152–162
196. Böttinger EP, and Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2600–2610
197. Yin S, Zhang Q, Yang J, Lin W, Li Y, Chen F, Cao W. TGFβ-incurred epigenetic aberrations of miRNA and DNA methyltransferase suppress Klotho and potentiate renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017 Jul;1864(7):1207-1216
198. Kramann R, Dirocco DP, Maarouf OH, Humphreys BD. Matrix Producing Cells in Chronic Kidney Disease: Origin, Regulation, and Activation. *Curr Pathobiol Rep.* 2013;1(4)
199. Cheng J, Grande JP. Transforming growth factor-beta signal transduction and progressive renal disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002;227(11):943-56
200. Ma C, Chegini N. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors in human myometrial smooth muscle cells by TGF-beta1. *Mol Hum Reprod* 1999;5(10):950-4.
201. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 1993;92(6):2597-601.
202. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, et al. Increased levels of transforming growth factor-beta in HIV-associated nephropathy. *Kidney Int* 1999;55(2):579-92
203. Yamamoto T, Watanabe T, Ikegaya N, et al. Expression of types I, II, and III TGFbeta receptors in human glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(12):2253-61
204. Shankland SJ, Pippin J, Pichler RH, et al. Differential expression of transforming growth factor-beta isoforms and receptors in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int* 1996;50(1):116-24
205. Tamaki K, Okuda S, Ando T, Iwamoto T, Nakayama M, Fujishima M. TGF-beta 1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis of adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 1994;45(2):525-36
206. Tsuchida K, Zhu Y, Siva S, Dunn SR, Sharma K. Role of Smad4 on TGF-beta-induced extracellular matrix stimulation in mesangial cells. *Kidney Int* 2003;63(6):20009
207. Piek E, Ju WJ, Heyer J, et al. Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276(23):19945-53
208. Yuan W, Varga J. Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem* 2001;276(42):38502-10
209. Kim JH, Kim BK, Moon KC, Hong HK, Lee HS. Activation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2003;64(5):1715-21

210. Li JH, Huang XR, Zhu HJ, et al. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *Faseb J* 2004;18(1):176-8
211. Nakagawa T, Li JH, Garcia G, et al. TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. *Kidney Int* 2004;66(2):605-13.
212. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal anti transforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(14):8015-20
213. Ma LJ, Jha S, Ling H, Pozzi A, Ledbetter S, Fogo AB. Divergent effects of low versus high dose anti-TGF-beta antibody in puromycin aminonucleoside nephropathy in rats. *Kidney Int* 2004;65(1):106-15.
214. Fierlbeck W, Liu A, Coyle R, Ballermann BJ. Endothelial cell apoptosis during glomerular capillary lumen formation in vivo. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(5):1349-54.
215. Patel P, Varghese E, Ding G, et al. Transforming growth factor beta induces mesangial cell apoptosis through NO- and p53-dependent and -independent pathways. *J Investig Med* 2000;48(6):403-10.
216. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13(4-5):413-21.
217. Peltier J, Perez J, Bellocq A, Escoubet B, Fouqueray B, Baud L. Transforming growth factor-beta 1 increases glucocorticoid binding and signaling in macrophages through a Smad- and activated protein-1-mediated process. *Kidney Int* 2003;63(6):2028-36.
218. McCartney-Francis N, Jin W, Wahl SM. Aberrant Toll receptor expression and endotoxin hypersensitivity in mice lacking a functional TGF-beta 1 signaling pathway. *J Immunol* 2004;172(6):3814-21
219. McKarns SC, Schwartz RH, Kaminski NE. Smad3 is essential for TGF-beta 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation. *J Immunol* 2004;172(7):4275-84
220. Feinberg MW, Shimizu K, Lebedeva M, et al. Essential role for Smad3 in regulating MCP-1 expression and vascular inflammation. *Circ Res* 2004;94(5):601-8.
221. Ng YY, Hou CC, Wang W, Huang XR, Lan HY. Blockade of NF kappa B activation and renal inflammation by ultrasound-mediated gene transfer of Smad7 in rat remnant kidney. *Kidney Int Suppl* 2005(94):S83-91
222. Lallemand F, Mazars A, Prunier C, et al. Smad7 inhibits the survival nuclear factor kappa B and potentiates apoptosis in epithelial cells. *Oncogene* 2001;20(7):879-84.
223. X.M. Meng, D.J. Nikolic-Paterson, H.Y. Lan, TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis, *Nat. Rev. Nephrol.* 12 (2016) 325–338.
224. Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell*, 2003, vol. 113 (pg. 685-700)

225. Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM, Alexandri S, Oldroyd S, Kalliakmani P, Vlachojannis JG. Transforming growth factor-beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant.* 2002 Dec;17(12):2145-52.
226. K. Sharma, Obesity, oxidative stress, and fibrosis in chronic kidney disease, *Kidney Int. Suppl.* 4 (2014) (2011) 113–117
227. K. Sharma, T.A. McGowan, TGF- $\beta$  in diabetic kidney disease: role of novel signaling pathways, *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11 115–123
228. G.X. Liu, Y.Q. Li, X.R. Huang, et al. Smad7 inhibits AngII-mediated hypertensive nephropathy in a mouse model of hypertension, *Clin. Sci. (Lond.)* 2014;127 195–208
229. W. Wang, X.R. Huang, E. Canlas, K. et al. Essential role of Smad3 in angiotensin II-induced vascular fibrosis, *Circ. Res.* 2006;98 1032–1039
230. Z. Liu, X.R. Huang, H.Y. Chen, E. Fung, J. Liu, H.Y. Lan, Deletion of angiotensin converting enzyme-2 promotes hypertensive nephropathy by targeting Smad7 for ubiquitin degradation, *Hypertension* 2017;70 822–830
231. B. Zhou, J. Mu, Y. Gong, C. Lu, Y. Zhao, T. He, Z. Qin, Brd4 inhibition attenuates unilateral ureteral obstruction-induced fibrosis by blocking TGF- $\beta$ -mediated Nox4 expression, *Redox Biol.* 2017;11 390–402
232. Y.Y. Wang, H. Jiang, J. Pan, X.R. Huang, Y.C. Wang, H.F. Huang, K.F. To, D.J. Nikolic-Paterson, H.Y. Lan, J.H. Chen, Macrophage-to-myofibroblast transition contributes to interstitial fibrosis in chronic renal allograft injury, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2017;28 2053–2067
233. A.C. Chung, H. Zhang, Y.Z. Kong, J.J. Tan, X.R. Huang, J.B. Kopp, H.Y. Lan, Advanced glycation end-products induce tubular CTGF via TGF- $\beta$ -independent Smad3 signaling, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010;21 249–260
234. N.M. Al-Rasheed, N.M. Al-Rasheed, M.A. Al-Amin, I.H. Hasan, H.N. Al-Ajmi, R.A. Mohammad, H.A. Attia, Fenofibrate attenuates diabetic nephropathy in experimental diabetic rat's model via suppression of augmented TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway, *Arch. Physiol. Biochem.* 2016;122 186–194
235. L. Zhou, P. Fu, X.R. Huang, F. Liu, A.C. Chung, K.N. Lai, H.Y. Lan, Mechanism of chronic aristolochic acid nephropathy: role of Smad3, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2010;298 F1006–1017
236. F. Verrecchia, M.L. Chu, A. Mauviel, Identification of novel TGF- $\beta$ /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach, *J. Biol. Chem.* 2001;276 17058–17062
237. H.Y. Lan, Transforming growth factor- $\beta$ /Smad signalling in diabetic nephropathy, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2012;39 731–738
238. J. Li, X. Qu, J. Yao, G. Caruana, S.D. Ricardo, Y. Yamamoto, H. Yamamoto, J.F. Bertram, Blockade of endothelial-mesenchymal transition by a Smad3 inhibitor delays the early development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy, *Diabetes* 2010;59 2612–2624
239. Guo K, Lu J, Kou J, Wu M, Zhang L, Yu H, Zhang M, Bao Y, Chen H, Jia W. Increased urinary Smad3 is significantly correlated with glomerular hyperfiltration and a reduced glomerular

filtration rate and is a new urinary biomarker for diabetic nephropathy. *BMC Nephrol.* 2015 Oct 8;16:159

240. Y. Zhou, H. Mao, S. Li, S. Cao, et al. HSP72 inhibits Smad3 activation and nuclear translocation in renal epithelial-to-mesenchymal transition, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21: 598–609

241. J.W. Leeuwis, T.Q. Nguyen, A. Dendooven, R.J. Kok, R. Goldschmeding, Targeting podocyte-associated diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010;62 1325–1336

242. S. Fu, Y. Tang, X.R. Huang, M. Feng, A.P. Xu, H.Y. Lan, Smad7 protects against acute kidney injury by rescuing tubular epithelial cells from the G1 cell cycle arrest, *Clin. Sci. (Lond.)* 2017;131 1955–1969

243. A. Li, X. Zhang, M. Shu, M. et al, Arctigenin suppresses renal interstitial fibrosis in a rat model of obstructive nephropathy, *Phytomedicine* 2017;30: 28–41

244. Chen H. Y., Huang X. R., Wang W., et al. The protective role of Smad7 in diabetic kidney disease: mechanism and therapeutic potential. *Diabetes* 2011; 60, 590–601

245. Chung A. C., Huang X. R., Zhou L., Heuchel R., Lai K. N., Lan H. Y. Disruption of the Smad7 gene promotes renal fibrosis and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. *Nephrol. Dial. Transplant* 2009; 24, 1443–1454

246. A.C. Chung, X.R. Huang, L. Zhou, R. Heuchel, K.N. Lai, H.Y. Lan, Disruption of the Smad7 gene promotes renal fibrosis and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice, *Nephrol. Dial. Transpl.* 2009;24 1443–1454

247. S.M. Ka, X.R. Huang, H.Y. Lan, et al. Smad7 gene therapy ameliorates an autoimmune crescentic glomerulonephritis in mice, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007;18: 1777–1788

248. A. Li, X. Zhang, M. Shu, M. Wu, J et al. Arctigenin suppresses renal interstitial fibrosis in a rat model of obstructive nephropathy, *Phytomedicine* 30 (2017) 28–41

249. H.Y. Lan, Transforming growth factor- $\beta$ /Smad signalling in diabetic nephropathy, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2012;39: 731–738.

250. X.M. Meng, X.R. Huang, J. Xiao, A.C. Chung, W. Qin, H.Y. Chen, H.Y. Lan, Disruption of Smad4 impairs TGF- $\beta$ /Smad3 and Smad7 transcriptional regulation during renal inflammation and fibrosis in vivo and in vitro, *Kidney Int.* 2012;81: 266–279

251. F. Yang, X.R. Huang, A.C. Chung, C.C. Hou, K.N. Lai, H.Y. Lan, Essential role for Smad3 in angiotensin II-induced tubular epithelial-mesenchymal transition, *J. Pathol.* 2010;221: 390–401

252. F. Yang, A.C. Chung, X.R. Huang, H.Y. Lan, Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor- $\beta$ dependent and -independent Smad pathways: the role of Smad3, *Hypertension* 2009;54: 877–884.

253. A.C. Chung, X.R. Huang, X. Meng, H.Y. Lan, miR-192 mediates TGF- $\beta$ /Smad3- driven renal fibrosis, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010;21: 1317–1325.

254. A. Li, X. Zhang, M. Shu, et al. Arctigenin suppresses renal interstitial fibrosis in a rat model of obstructive nephropathy, *Phytomedicine* 2017;30: 28–41

255. H.Y. Lan, Transforming growth factor- $\beta$ /Smad signalling in diabetic nephropathy, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2012;39: 731–738

256. Y.Y. Ng, C.C. Hou, W. Wang, X.R. Huang, H.Y. Lan, Blockade of NF kappaB activation and renal inflammation by ultrasound-mediated gene transfer of Smad7 in rat remnant kidney, *Kidney Int. Suppl.* (2005) S83–91
257. H.Y. Lan, Smad7 as a therapeutic agent for chronic kidney diseases, *Front. Biosci.* 13 (2008) 4984–4992.
258. Chen HY, Huang XR, Wang W, et al. The protective role of Smad7 in diabetic kidney disease: mechanism and therapeutic potential. *Diabetes* 2011; 60: 590–601
259. US National Library of Science. *ClinicalTrials.gov* [online], <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01113801> (2015).
260. Dou F, Ding Y, Wang C, et al. Chrysophanol ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 2020 Oct;180:114079
261. Wu W, Jiang XY, Zhang QL, Mo Y, Sun LZ, Chen SM. Expression and significance of TGF-beta1/Smad signaling pathway in children with IgA nephropathy. *World J Pediatr.* 2009 Aug;5(3):211-5
262. Koutrotsos K, Kassimatis TI, Nomikos A, Giannopoulou I, Theohari I, Nakopoulou L. Effect of Smad pathway activation on podocyte cell cycle regulation: an immunohistochemical evaluation. *Ren Fail* 2014 Sep;36(8):1310-6
263. Banas MC, Parks WT, Hudkins KL, et al. Localization of TGF- $\beta$  Signaling Intermediates Smad2, 3, 4, and 7 in Developing and Mature Human and Mouse Kidney. *J Histochem Cytochem* 2007;55(3):275-85.
264. Schiffer M, Schiffer LE, Gupta A, et al. Inhibitory smads and tgf-Beta signaling in glomerular cells. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(11):2657-66.
265. Ito Y, Goldschmeding R, Kasuga H, et al. Expression patterns of connective tissue growth factor and of TGF- $\beta$  isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: 545–558
266. Kim JH, Kim BK, Moon KC, Hong HK, Lee HS. Activation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2003 Nov;64(5):1715-21
267. Lopes TG, Lucena de Souza M, Duval da Silva V, et al. Markers of renal fibrosis: How do they correlate with podocyte damage in glomerular diseases? *PLoS ONE* 2019; 14(6): e0217585
268. Shimizu M, Kondo S, Urushihara M, et al. Role of integrin-linked kinase in epithelial mesenchymal transition in crescent formation of experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21:2380–2390
269. Meng XM, Zhang Y, Huang XR, Ren G, Jun Li, Lan HY. Treatment of renal fibrosis by rebalancing TGF- $\beta$ /Smad signaling with the combination of asiatic acid and naringenin. *Oncotarget* 2015 Nov 10;6(35):36984-97
270. Chen R, Huang C, Morinelli TA, Trojanowska M, Paul RV. Blockade of the effects of TGF-beta1 on mesangial cells by overexpression of Smad7. *J Am Soc Nephrol* 2002; Apr;13(4):887-93
271. Gewin L. The Many Talents of TGF- $\beta$  in the Kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2019; May; 28(3): 203–210