

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΙΤΑΣ
ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
ΣΤΗΝ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ
ΑΠΟ ΑΜΙΝΟΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΟ ΤΗΣ
ΠΟΥΡΟΜΥΚΙΝΗΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΣ

(Πειραματική εργασία)

ΓΕΩΡΓΙΟΥ Ν. ΜΑΡΙΝΙΔΗ
ΙΑΤΡΟΥ ΝΕΦΡΟΛΟΓΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1990

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΙΤΑΣ
ΧΑΜΗΛΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ
ΣΤΗΝ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ
ΑΠΟ ΑΜΙΝΟΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΟ ΤΗΣ
ΠΟΥΡΟΜΥΚΙΝΗΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΣ**

(Πειραματική εργασία)

ΓΕΩΡΓΙΟΥ Ν. ΜΑΡΙΝΙΩΝ

ΙΑΤΡΟΥ ΝΕΦΡΟΛΟΓΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Β. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΝΕΦΡΙΚΟΥ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ
2. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ
ΕΣΤΙΑΚΗΣ ΤΜΗΜΑΤΙΚΗΣ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ
ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ (ΕΤΣΣ)
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΣΤΙΑΚΗΣ
ΤΜΗΜΑΤΙΚΗΣ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΠΡΟΙΟΥΣΑΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ
ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Γ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ
6. SUMMARY

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εστιακή τμηματική σκλήρυνση του νεφρικού σπειράματος (ΕΤΣΣ) αποτελεί συχνή ιστολογική βλάβη που είτε χαρακτηρίζεται- σαν αρχικό και κύριο κέρημα- το κλινικό σύνδρομο του ιδιοπαθούς ανθεκτικού σε στεροειδή νεφρωσικού συνδρόμου, είτε συνοδεύει τα τελικά στάδια ποικίλων νόσων του νεφρικού παρεγχύματος. Έχουν περιγραφεί διάφορα πειραματικά πρότυπα που εμφανίζουν ιστολογικά αυτήν την βλάβη και τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για διερεύνηση της παθογένειας της ΕΤΣΣ καθώς και για εξέταση της επίδρασης σε αυτή διαφόρων θεραπευτικών παρεμβάσεων.

Η σχετική ερευνητική προσέγγιση αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω της σχέσης της ΕΤΣΣ με το φαινόμενο της προϊούσας απώλειας νεφρικής λειτουργίας μέχρι την εμφάνιση "νεφρικής νόσου τελικού σταδίου". Αυτή αποτελεί συχνά το κοινό τελικό αποτέλεσμα ποικίλων- σεείας ή υποείας φύσης- προσβολών του σπειράματος ακόμα και όταν το αρχικό ξένασμα της βλάβης έχει προ πολλού υποχωρήσει.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση δίαιτας περιορισμένης πρωτεΐνης στην εξέλιξη της πρωτεϊνουρίας και της εστιακής σκλήρυνσης στο πειραματικό πρότυπο της χρόνιας νεφροπάθειας από αμινοουκλεοσίδιο της πουρομυκίνης σε επίμυς. Τα σχετικά πειράματα έγιναν στο εργαστήριο του τμήματος Νεφρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Utah υπό την επίβλεψη των καθηγητών Wayne A. Border και Gerald C. Groggel. Ο καθηγητής Παθολογίας Νεφρολόγος κ. Δημήτριος Εμμανουήλ ανέλαβε την ευθύνη του επιβλέποντος για την εκπόνηση της διατριβής στο Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΝΑΤΟΜΙΑ -ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΝΕΦΡΙΚΟΥ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Το νεφρικό σπείραμα (ή νεφρικό σωματίο)* που αντιστοιχεί στο αρχικό τμήμα κάθε νεφρώνα αποτελείται από αγγειακά και επιθηλιακά στοιχεία. (1.2)

Το προσαγωγό αρτηρίδιο (κλάδος μιας μεσολαβίδιας αρτηρίας), αφού εισέλθει στο σπείραμα, διαιρείται σε αριθμό τριχοειδών ποικίλου μήκους που τελικά επανακάμπτον προς τον αγγειακό πόλο και συνεχόμενα σχηματίζουν το απαγωγό αρτηρίδιο, που στη συνέχεια αναλύεται στα περιωληναριακά τριχοειδή. Ο τριχοειδικός σπειραματικός θύσανος (αγγειώδες σπείραμα) επικαλύπτεται από επιθηλιακά κύτταρα που αρχίζοντας από μία σκελετική διεύρυνση του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου (τον ουρικό πόλο του σπειράματος), επεκτείνονται μέχρι τον αντιδιαμετρικά τοποθετημένο αγγειακό πόλο, όπου ανακάμπτον. Έτσι επιθηλιακά στοιχεία περιβάλλουν τόσο τα τριχοειδικά δίκτυα του σπειράματος (περιπλάγγνιο πέταλο), όσο και την ίση επιφάνεια (περίτονο πέταλο) της κάψας του Bowman. Σε κάθε σπείραμα δημιουργούνται έτσι δύο χώροι: ο ενδοτριχοειδικός (αιματικός) και ο ουροφόρος χώρος (χώρος του Bowman) που διαχωρίζονται από δύο στρώματα κυττάρων- τα ενδοθηλιακά και τα σπλαγγνικά επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα)- καθώς και την μεταξύ τους παρεμβλλόμενη σπειραματική βασική μεμβράνη (SBM) ή βασικό υμένα*.

* Ο δεύτερος όρος είναι ορθότερος γλωσσικά, παρ' όλα αυτά ο πρώτος όρος έχει επικρατήσει στην νεφρολογική βιβλιογραφία και θα χρησιμοποιηθεί στα παρόν κείμενα.

Κατά θέσεις μεταξύ της ενδοθηλιακής και της σπλαγγχνικής επιθηλιακής στοιβάδας παρεμβάλλεται και τρίτος τύπος κυττάρων, τα μεσαγγειακά κύτταρα, που ουσιαστικά αποτελούν παραλλαγή και επέκταση των λείων μυϊκών ινών του μέσου χιτώνα του προσαγωγού αρτηριδίου, έχοντας χαρακτηριστικά μυοεπιθηλιακών κυττάρων. Αυτά περιβάλλονται από την μεσαγγειακή θεμέλια ουσία που χωρίς σαφή διάκριση μεταπίπτει στην πειραματική βασική μεμβράνη (IBM).

Τα προσαγγα αρτηρίδια διαθέτουν καλά αναπτυγμένο μυϊκό χιτώνα και ενδοθηλιακά κύτταρα που προέχουν μέσα στον αυλό. Αντίθετα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των πειραματικών τριχοειδών είναι λεπτότερα (1-2 μm εκτός από την περιοχή του πυρήνα) και εμφανίζουν θυρίδες (fenestrations), διαμέτρου 500- 1000 Å, οι οποίες δεν φράζονται από διαφράγματα επιτρέποντας έτσι άμεση επαφή με την υποκείμενη βασική μεμβράνη. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτονται από γλυκοκάλυκα, πάχους 150 Å, που αποτελείται από αρνητικά φορτισμένες σιαλογλυκοπρωτεΐνες.

Η πειραματική βασική μεμβράνη (IBM) δημιουργείται από την συνένωση της ενδοθηλιακής και της επιθηλιακής βασικής μεμβράνης κατά τον αγγειακό πόλο(*) και παρουσιάζεται (στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο) ως αποτελούμενη από 3 στρώματα στο μέσο την σκοτεινότερη πυκνή στοιβάδα (lamina densa) και εκατέρωθεν τις διαυγέστερες μέσα και έξω αραιές στοιβάδες (lamina rara interna και externa). Το συνολικό πάχος της IBM στον άνθρωπο είναι 310-330 nm, ενώ στους εκίμους είναι περίπου 130 nm.

(*) Η περιγραφή στο σημείο αυτό είναι καθαρά μορφολογική και δεν υπαινίσσεται συγκεκριμένο μηχανισμό συντήρησης και αναγέννησης υλικού της IBM, ιδιαίτερα σε σχέση με την επί μέρους συμβολή των τριών ειδών πειραματικών κυττάρων.

Η χημική της σύσταση περιλαμβάνει κολλαγόνο τύπου IV, πρωτεογλυκάνες και διάφορες γλυκοπρωτεΐνες, όπως λαμινίνη και φιμπρονεκτίνη, που θερμολογικά δίνουν στην ZBM ισχυρό αρνητικό φορτίο.

Ο χαρακτηρισμός των πειραματικών κυττάρων ως επιθηλιακών είναι κάπως παραπλανητικός, γιατί εμβρυολογικά τα κύτταρα αυτά δεν είναι εξωδερμικής αλλά μεσοδερμικής (μεσεγγυματογενούς) προέλευσης. Τα σπλαγχνικά επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα), που επικαλύπτουν την προς τον ^{επιθηλιακό} ~~αυριανό~~ χώρο προσανατολισμένη επιφάνεια της ZBM, έχουν σγκώδη σώματα με ελαφροχρωματικούς πυρήνες που προέχουν στον χώρο του Bowman. Από αυτά εκφύονται προεκχέες που, αφού διακλαδωθούν περισσότερο επικαθονται στην έξω αραιά στοιβάδα της ZBM κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι ποδικές αυτές εκπλαστικές γειτονικών ποδοκυττάρων να βρίσκονται διαταγμένες η μία πλάι στην άλλη σαν διαπλεγμένα δάκτυλα δύο χεριών (foot process interdigitation), αφήνοντας μεταξύ τους διαστήματα 250- 400 Å (σχισμοειδείς θυρίδες) που καλύπτονται από τα σχισμοειδή διαφράγματα. Τα ποδοκύτταρα καλύπτονται επίσης από πολυσανιοειδή γλυκοκάλυκα (σιαλογλυκοπρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες), πάχους 200- 600 Å. Έτσι και τα τρία στρώματα του πειραματικού πημού (ενδοθήλιο, ZBM, ποδοκύτταρα) συμβάλλουν ώστε αυτός να έχει ισχυρό αρνητικό συνολικό φορτίο.

Τα επιθηλιακά κύτταρα αλλάζουν μορφολογία καθώς ανακάμπτουν από τον αγγειακό πόλο μεταπίπτοντας στο πλακώδες τοιχωματικό επιθήλιο της κάψας του Bowman και μαζί με την βασική τους μεμβράνη αφορίζουν το σπείραμα από τον διάμεσο νεφρικό ιστό. Κατά τον αυρικό πόλο τα επιθηλιακά κύτταρα του περιτόνου πετάλου

μεταπίπτουν στο κυλινδρικό μονόστιμο επιθήλιο του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. Τα μεσαγγειακά κύτταρα, που αναφέρθηκαν προηγουμένως, φαίνεται ότι εκτελούν πολλαπλές λειτουργίες. Έχουν την ικανότητα να συσπώνται -σε ανταπόκριση προς αγγειοτασίνη II και βαζοπρεσίνη- πιθανόν ρυθμίζοντας έτσι την διαβατότητα επί μέρους τριχοειδικών αγκυλών του σπειράματος και συνεπώς την αιματική ροή και υπερδιήθηση κατά νεφρώνα. Επιπλέον τα μεσαγγειακά κύτταρα συνθέτουν πρωτεογλυκάνες και άλλα δομικά μακρομόρια της μεσαγγειακής θεμέλιας ουσίας όπως και πιθανόν της ΣΒΜ, και έχουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες (3). Ένα μικρό ποσοστό τους (1- 2%) φαίνεται να αποτελείται από ιστικά μακροφάγα (4). Το σπειραματικό τριχοειδικό τοίχωμα (ενδοθήλιο, ΣΒΜ, ποδοκύτταρο) είναι ελεύθερα διαπερατό στο νερό και σε μικρομοριακές ενώσεις (κρυσταλλοειδή) που κυκλοφορούν ελεύθερες- μη συνδεδεμένες με πρωτεΐνες του πλάσματος. Η διήθηση μακρομορίων επηρεάζεται όμως από το μοριακό του μέγεθος (ή μοριακή ακτίνα), το σχήμα τους (σφαιρικό ή επιμήκη) και το ηλεκτρικό τους φορτίο (κατά σειρά αυξανόμενης διαπερατότητας: ανιονικά < ουδέτερα < κατιονικά μακρομόρια) (5). Έτσι, για μόρια με ακτίνα κάτω από 2 nm η διήθηση είναι πρακτικά ελεύθερη και για μόρια ακτίνας πάνω από 4.4nm ουσιαστικά αδύνατη, ενώ για μοριακά μεγέθη μεταξύ 2 nm και 4.4 nm ο καθοριστικός παράγοντας διαπερατότητας μέσω του σπειραματικού πημού είναι κυρίως το ηλεκτρικό φορτίο του μορίου. Προφανώς αυτό οφείλεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (έλξεις και απώσεις) μεταξύ κυκλοφορούντων μακρομορίων και πολυανιονικών μακρομορίων του σπειραματικού τριχοειδικού τοιχώματος.

Καθώς το αίμα διέρχεται μέσα από τα πειραματικά τριχοειδή, ένα ποσοστό του νερού του πλάσματος και τα μόρια που βρίσκονται διαλυμένα μέσα σ'αυτό, διηθούνται προς τον χώρο του Bowman σχηματίζοντας το πύρραιο, που είναι πρακτικά ελεύθερο πρωτεϊνών. Οι παράμετροι που επηρεάζουν την κατά νεφρώνα διήθηση (δ) εκφράζονται από την σχέση :

$$SNGFR = K_f \cdot P_{wf}$$

όπου SNGFR : διήθηση κατά νεφρώνα στη μονάδα χρόνου

K_f : συντελεστής διήθησης

και P_{wf} : μέση πίεση διήθησης.

Με την σειρά τους :

$$K_f = K \cdot S$$

όπου K : η υδραυλική αγωγιμότητα του πειραματικού τριχοειδικού τοιχώματος

και S : η διαθέσιμη για διήθηση τριχοειδική επιφάνεια

Η P_{wf} καθορίζεται από την διαφορά υδροστατικών και κολλοειδωσμητικών πιέσεων εκατέρωθεν του τριχοειδικού τοιχώματος και επηρεάζεται έμμεσα από την πειραματική ροή αίματος (QIA) και τις αντιστάσεις σ'αυτή, κυρίως στα επίπεδα του προσαγωγού και απαγωγού αρτηριδίου. Διάφορες αγγειοκινητικές ουσίες, όπως η αγγειοτενσίνη II και οι κατεχολαμίνες, επηρεάζουν την πειραματική διήθηση κυρίως μέσω εκλεκτικής (ανάλογα με την συγκέντρωσή τους) σύσπασης του προσαγωγού, απαγωγού ή και των δύο αρτηριδίων, όπως και πιθανώς μέσω σύσπασης των μεσαγγειακών κυττάρων, που με τη σειρά της επηρεάζει τον K_f . Διάφορες

... φλεγμονώδεις ή υπερπλαστικές εξεργασίες στο σπείραμα μπορούν να μειώσουν δραστικά την SNGFR επηρεάζοντας επίσης τον Kf μέσω ελάττωσης της υδραυλικής αγωγιμότητας (K) ή/και της προς διήθηση διαθέσιμης επιφάνειας της πειραματικής τριχοειδικής κοίτης (S). Τουλάχιστον στον άνθρωπο, οι παραπάνω φυσιολογικές παράμετροι φαίνεται να ρυθμίζονται διαφορετικά στους επιπολής και στους εν τω βάθει (παραμυελικούς) νεφρώνες. Είναι ενδιαφέρον ότι, επίσης στον άνθρωπο πάλι, οι παραμυελικοί νεφρώνες παρουσιάζουν ιδιαίτερη τάση προς ανάπτυξη σπειραματοσκλήρυνσης.

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΤΣΣ

Η ΕΤΣΣ είναι μια ιστολογική αλλοίωση που συναντάται χαρακτηριστικά σε συνάρτηση με ιδιοπαθή νεφρωσικό σύνδρομο "επιπροστιθέμενη" σε υποκείμενη εικόνα είτε ελάχιστων αλλοιώσεων (minimal change) ή κάποιου βαθμού μεσαγγειακής κυτταροβρίθειας και αύξησης της θεμέλιας ουσίας (7). Σε αυτές τις περιπτώσεις παρουσία πλήρως (globally) σκληρωθέντων σπειραμάτων ερμηνεύεται ως αποτέλεσμα παραπέρα εξέλιξης της πρωταρχικής βλάβης. Η μορφολογική εικόνα ΕΤΣΣ, όταν αναγνωρίζεται ως πρωτοπαθής σπειραματοπάθεια, χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερη νασολογική οντότης και ονομάζεται Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκληρίωση (Focal Segmental Glomerular Sclerosis, FSGS). Είναι φανερή η ανεπάρκεια αυτού του περιγραφικού όρου που χρησιμοποιείται για την περιγραφή άλλοτε μιας ιστολογικής βλάβης και άλλοτε μιας συγκεκριμένης νόσου. Η σχέση της νόσου Εστιακής Τμηματικής Σπειραματοσκληρίωσης προς αυτή των Ελάχιστων Αλλοιώσεων παραμένει αμφισβητούμενη, αν και τελευταία τείνει να επικρατήσει η άποψη πως πρόκειται για δύο διαφορετικές νασολογικές οντότητες, που έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα, από μορφολογική μεν άποψη την εδάφιση επιθηλιακών ποδίσκων, από κλινική δε άποψη, το νεφρωσικό σύνδρομο. Η άποψη αυτή ενισχύεται από την παρατήρηση ότι στην νόσο των ελάχιστων αλλοιώσεων φαίνεται ότι τελικά δεν παρουσιάζονται βλάβες ΕΤΣΣ ή προοδευτική απώλεια σπειραματικής διήθησης, επιπλέον δε η ανταπόκριση στην θεραπεία με στεροειδή είναι διαφορετική στις δύο βλάβες (8).

Εκτός αυτού η ιστολογική εικόνα ΕΤΣΣ ανευρίσκεται σε προχωρημένα

στάδια πληθώρας άλλων νεφρικών νόσων, όπως στην νεφροπαθεία από καλινδρομήση ούρων, από κατάχρηση αναλγητικών ή ηρωίνης, στην νόσο του Alport, οικογενή δυσσαυτονομία, δρεπανοκυτταρική νόσο, χρόνια απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος, σαρκοείδωση, λεμφώματα, χρόνια μεταλοιμώδη σπειραματονεφρίτιδα και τέλος τα τελικά στάδια διαφόρων υπερπλαστικών ή νεκρωτικών μορφών σπειραματονεφρίτιδας (7).

Η ΕΤΣΣ σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις φαίνεται να παρουσιάζεται στα πλαίσια της προοδευτικής απώλειας νεφρώνων, που παρατηρείται αφού καταστραφεί μία ωρισμένη "κρίσιμη" μάζα νεφρικού παρεγχύματος, ανεξαρτήτως της αρχικής αιτίας της νεφρικής βλάβης.

Η ακριβής περιγραφή της ΕΤΣΣ ποικίλει σε κάποιο βαθμό μεταξύ διαφόρων πηγών στην βιβλιογραφία και υπάρχει σχετική αμειβοσύνη τόσο αναφορικά με τις πρώιμες μορφές όσο και με την παθογένεια και αιτιολογία της. Είναι συνεπώς αναγκαίο να διευκρινισθεί η διεθώς ευρύτερα καθιερωμένη έννοια ωρισμένων όρων, που χρησιμοποιούνται και στην παρούσα μελέτη.

Κατά τους W.Thoenes και H.J.Rumpelt (9) σε πλήρως σκληρωμένα σπειράματα (obsolescent glomeruli) είναι δυνατό με ειδικές

(8) Η ΕΤΣΣ ανευρίσκεται σε άλλοτε άλλη συχνότητα στις παραπάνω νόσους και είναι ενδιαφέρον ότι υπάρχει σαφής θετική συσχέτιση της ΕΤΣΣ και του νεφρωσικού βαθμού πρωτεϊνουρίας σε αυτές (RUBIN R. H., TOLKOFF- RUBIN NE, COTRAN RS : Urinary tract infection, Pyelonephritis and Reflux nephropathy m. BRENNER BM, RECTOR FC. The Kidney (3rd edition, W.B. SAUNDERS CO), p.1116- 117 και αντίστοιχα κεφάλαια στο ίδιο βιβλίο).

χρώσεις και ηλεκτρονική μικροσκοπία να διακριθούν μόνες ή συνήθως σε συνδυασμό οι παρακάτω αλλοιώσεις :

1) Σκλήρυνση (sclerosis), που αφορά κυρίως αύξηση της μεσαγγειακής θεμελίου ουσίας (αργυρόφιλου, PAS(+) υλικού με λεπτή λιγδωδη δομή στο HM) σε συνδυασμό με παραμόρφωση και σύμπτυξη των τριχοειδικών αυλών.

2) Υαλίνωση (hyalinosis) που αναφέρεται στην ανεύρεση υαλίνης ουσίας (hyaline substance -μη αργυρόφιλου, PAS(+) υλικού, με λεπτότατη κοκκιώδη εμφάνιση -κοκκία 100Α στο HM). Υαλίνη εναποτίθεται κυρίως εντός των τριχοειδικών αυλών με αποτέλεσμα πλήρη ή μερική τους απόφραξη, αλλά παρατηρείται επίσης και μέσα στην μεσαγγειακή θεμέλια ουσία.

3) Ύψωση (fibrosis), που αναφέρεται στην πλήρωση του χώρου του Bowman με ίνες κολλαγόνου.

4) Συμπτυγμένα τμήματα βασικής μεμβράνης (collapsed basement membranes).

Παρόμοια χαρακτηριστικά γνωρίσματα με αυτά που περιγράφηκαν πιο πάνω για ολοσχερώς σκληρωμένα σπειράματα είναι δυνατόν να παρατηρηθούν και στην εστιακή/ τμηματική βλάβη και η έμφραση που δίνεται στην ύπαρξη της μιας ή της άλλης μορφής ποικίλλει ανάλογα με τον συγγραφέα.

Έτσι η R.Habib (10) την περιγράφει ως εξής :

"Η αλλοίωση φαίνεται να είναι πιο συχνή στα παραμυελικά σπειράματα. Σε πρώτη φάση το κυριώτερο χαρακτηριστικό της είναι η εντοπισμένη εναπόθεση υαλίνης στο αλλοιωμένο τμήμα του

σπειράματος, χωρίς αυξημένο αριθμό κυττάρων. Στο μέσο της υαλοποιημένης περιοχής μπορεί να υπάρχουν υπενδοθηλιακές ενιδροειδείς εναποθέσεις καθώς και "αφρώδη" ενδοτριχοειδικά κύτταρα. Αργότερα η τμηματική βλάβη χαρακτηρίζεται από αύξηση της μεσαγγειακής ενιδρώδους ουσίας ενώ η εναπόθεση υαλίνης και η σκλήρυνση συνήθως συνυπάρχουν. Τελικά όλες αυτές οι μεταβολές προκαλούν απόφραξη τριχοειδικών αυλών και οι αλλοιωμένες τριχοειδικές αγκύλες κολλούν ακανόνιστα μεταξύ τους καθώς και με το γειτονιάζον τμήμα της κάψας του Bowman. Επιθηλιακοί μηνίσκοι δεν παρατηρούνται σχεδόν ποτέ. Το υπόλοιπο τμήμα του αγγειώδους σπειράματος καθώς και τα άλλα σπειράματα δείχνουν μόνο "ελάχιστες αλλοιώσεις". Επιπρόσθετα όμως μπορεί να παρατηρηθεί ήπια, διάχυτη μεσαγγειακή υπερπλαστική αντίδραση. Αγγειακές αλλοιώσεις παρατηρούνται σπάνια, κυρίως με την μορφή υπενδοθηλιακής υαλίνωσης του προσεγγικού αρτηριδίου. Σχεδόν πάντα παρατηρείται ατροφία σωληναρίων, σωληναριακοί κύλινδροι πρωτεϊνικού υλικού, όπως και διάμεση ίνωση σε βαθμό ανάλογο με τις σπειραματικές βλάβες".

Γι' αυτό το λόγο, όταν σε υλικό βιοψίας παρατηρούνται παρόμοιες αλλοιώσεις του σωληναριοδιάμεσου ιστού ενώ τα προς εξέταση διαθέσιμα σπειράματα εμφανίζουν μόνο "ελάχιστες αλλοιώσεις", πρέπει να διατυπώνεται υποψία ύπαρξης "Εστιακής Τμηματικής Σπειραματοσκλήρυνσης" παρά απλώς νόσου "Ελάχιστων Αλλοιώσεων". Συνήθως αυτό είναι το αποτέλεσμα δειγματοληπτικού σφάλματος και το διαθέσιμο δείγμα (ιδιαίτερα αν δεν περιέχει παραμυελικό ιστό) δεν έτυχε να περικλείει αλλοιωμένα σπειράματα. Πέρα από τις λεπτομέρειες υφής της σκληρυντικής

και της υαλίνης ουσίας, έχουν συχνά περιγραφεί με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διάφορες αλλοιώσεις στην επιθηλιακή πλευρά του τριχοειδικού τοιχώματος, οι οποίες συνοδεύουν σταθερά τις καθ' αυτές βλάβες της ΕΤΣΣ. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αριθμός μικρών μέχρι και γιγαγντιαίων κενотоπιών στα ποδοκύτταρα, τα οποία κατά τόπους γάνουν επαφή με την ΙΒΜ. Σε αυτά τα σημεία απογύμνωση της ΙΒΜ εναποτίθενται κυτταρικά υπολείμματα και άμορφη ενιδώδης ουσία, που είτε δημιουργεί συμφύσεις με την κάψα του Bowman ή καλύπτεται ξανά από γειτονικά ποδοκύτταρα. Μεταξύ της ουσίας αυτής και του ποδοκυττάρου παρεμβάλλεται συχνά λεπτή στοιβάδα βασικής μεμβράνης (αναδιπλασιασμός της ΙΒΜ). Όταν η παραμόρφωση αυτή του υπεπιθηλιακού χώρου είναι εκτεταμένη, η ΙΒΜ πτυχώνεται και συμπύσσεται δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο την χαρακτηριστική σκλήρυνση τμήματος του σπειρώματος. Συχνά οι άμορφες αυτές υπεπιθηλιακές εναποθέσεις διακρίνονται και με οπτικό μικροσκόπιο υπό μορφή αλω (halo). Επί πλέον το ΗΜ δείχνει περισσότερα ή λιγότερα διάχυτη εδάσειση των επιθηλιακών ποδίσκων καθώς και σταγονίδια επαναρρόφησης πρωτεΐνης στο κυτταρόπλάσματος ποδοκυττάρων (χαρακτηριστικά ευρήματα νεφρωσικού συνδρόμου) (7,10). Η ύπαρξη των πιο πάνω επιθηλιακών βλαβών έχει περιγραφεί σε μια ποικιλία ανθρώπινων σπειραματοπαθειών που αργότερα παρουσιάζουν εστιακή, τμηματική και τελικά ολοσχερή σκλήρυνση σπειραμάτων(11).

Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η παθογένεια της ΕΤΣΣ σχετίζεται κυρίως με βλάβη των ποδοκυττάρων, τα οποία για διάφορους λόγους (ανάλογα με την συγκεκριμένη νόσο) περνούν από μία σειρά αλλοιώσεων που περιλαμβάνουν φόρτιση με

πρωτεϊνικά σταγονίδια από επαναρρόφηση, κενοτοπιώδη εκφύλιση, αποκόλληση από την ΣΒΜ σε ποικίλη έκταση με τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη της πειραματικής σκλήρυνσης.

Εναλλακτικά η παθογένεια της ΕΤΣΣ έχει αποδοθεί σε υπερφόρτιση του μεσαγγείου (12, 13, 14). Συγκεκριμένα έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι χρόνια κατακράτηση μακρομοριακών ουσιών (π.χ. ανοσοσυμπλόκματων, συνάθλευμάτων γ-σφαιρινών κλπ.) στον μεσαγγειακό χώρο προκαλεί αντιδραστικά αυξημένο πολλαπλασιασμό μεσαγγειακών κυττάρων και υπερπαραγωγή θεμέλιας ουσίας με τελικό αποτέλεσμα την ΕΤΣΣ.

Οι υπάρχουσες γνώσεις είναι ακόμα πτωχότερες αναφορικά με την αιτιολογία της ΕΤΣΣ, δηλαδή την αρχική διαταραχή που κινητοποιεί οποιονδήποτε από τους δύο παραπάνω παθολογικούς μηχανισμούς παθογένεσης. Σχετικά έχουν ενοχοποιηθεί ανοσοσυμπλόματα, δυσλειτουργία Τ- λεμφοκυττάρων, χυμικοί παράγοντες της συστηματικής κυκλοφορίας, διαταραχές αιμοστατικών διεργασιών, ενδοπείραματική υπέρταση και άλλες πιθανές αιτίες, χωρίς όμως για καμία από αυτές να υπάρχει πειραματική ή κλινική τεκμηρίωση (7). Παρομοίως δεν υπάρχει ικανοποιητική εξήγηση της- τουλάχιστον αρχικά- εστιακής φύσης των αλλοιώσεων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΤΣΣ

Η διερεύνηση της αιτιολογίας και παθογένειας της ΕΤΣΣ έχει στηριχθεί κατά κύριο λόγο στην μελέτη προτύπων της βλάβης σε πειραματόζωα, συχνότερα χρησιμοποιούμενα των οποίων είναι τα παρακάτω:

1) Υφολική νεφρεκτομή (subtotal renal ablation) (12), που έχει μελετηθεί κυρίως σε επίμυς. Τρεις με τέσσερις εβδομάδες μετά μονόπλευρη νεφρεκτομή και αφαίρεση των 2/3 ή 5/6 του ετερόπλευρου νεφρού τα ζώα αναπτύσσουν πρωτεϊνουρία, υπέρταση και τελικά αθροαιμία. Η κυριότερη ιστολογική βλάβη στο νεφρικό υπόλειμμα μοιάζει πολύ με αυτή που περιγράφηκε ήδη για την ανθρώπινη ΕΤΣΣ. Παρατηρείται δε προσδευτική επιδείνωση ανάλογα με το χρονικό διάστημα που διέρρευσε από την εγχείρηση. Το παρασκευάσμα αυτό ή παραλλαγές του έχει χρησιμοποιηθεί πολλές φορές σε συνδυασμούς με τα παρακάτω περιγραφόμενα πρότυπα.

2) Σακχαρώδης διαβήτης από στρεπτοζοτοκίνη (Streptozotocin induced diabetes mellitus). (15) Έχει μελετηθεί επίσης κυρίως σε επίμυς, η ενδοκρινής μούρα του παγκρέατος των οποίων καταστρέφεται με ενδοφλέβια ένεση στρεπτοζοτοκίνης (60 mg/kg). Ανάλογα με τις ανάγκες του συγκεκριμένου πειράματος, χορηγείται ινσουλίνη σε κατάλληλες δόσεις ή καθόλου, ώστε να διατηρείται η γλυκαιμία στο επιθυμητό επίπεδο. Μετά παρέλευση 12-14 μηνών ανευρίσκεται ΕΤΣΣ σε 4-8% των πειραμάτων, ενώ τα ζώα παρουσιάζουν πολύ ενωρίτερα νεφρωσικής βαρύτητας πρωτεϊνουρία, υπέρταση και τελικά αθροαιμία. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ιστολογική εικόνα στα μετρώς υπεργλυκαιμικά ζώα είναι πολύ όμοια με

εκείνη του προηγούμενου προτύπου και δεν παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα προς την βλάβη της διαβητικής σπειραματοσκλήρυνσης σε ανθρώπους.

3) Νεφροπάθεια από αδριαμυκίνη. Έχει μελετηθεί επίσης σε επίμους, στους οποίους χορηγείται αδριαμυκίνη ενδοφλέβια σε μία ή δύο δόσεις. Η προς τα παρόν πληρέστερη μελέτη αυτού του προτύπου, αφορά στην ενδοφλέβια χορήγηση δύο δόσεων αδριαμυκίνης (2 mg/ kg) σε διάστημα 20 ημερών και στην συνέχεια παρακολούθηση των λειτουργικών μεταβολών (πρωτεϊνουρία, αιμωθαιμία) και ιστολογικών αλλοιώσεων για διάστημα μέχρι και 28 εβδομάδων (16). Το πρότυπο αυτό χαρακτηρίζεται από νεφρωσικού επιπέδου πρωτεϊνουρία, υποπρωτεϊναιμία, υπερχοληστερολαιμία και προοδευτική αιμωθαιμία. Οι ιστολογικές βλάβες περιορίζονται αρχικά στα ποδοκύτταρα (όμοιες μ' αυτές που ήδη περιγράφηκαν για την ανθρώπινη νόσο), ενώ μεταξύ της 16ης και της 28ης εβδομάδας αυξάνει προοδευτικά και η συχνότητα ΕΤΣΣ (κυρίως με υαλίνωση). Παρόμοια πορεία και επιπτώσεις έχουν περιγραφεί μετά χορήγηση μιας δόσης αδριαμυκίνης, 5 mg/kg (17).

4) Νεφροπάθεια από Αμινογουκλεοσίδιο της πουρομυκίνης (NAP). Το αμινογουκλεοσίδιο της πουρομυκίνης (AP) είναι τμήμα του μορίου του αντιβιοτικού πουρομυκίνη και απομονώνεται με χημικό διαχωρισμό του αμινογουκλεοσιδίου από το αμινοξύ (παρά- μεθόξυ-φαινυλαλανίνη) του όλου μορίου (18). Οι αντίστοιχοι συντακτικοί τύποι, καθώς και ο τύπος της 2- δεοξυ- αδενοσίνης, που είναι ένα από τα φυσιολογικά νουκλεοσίδια του μορίου του DNA, παρουσιάζονται στο Σχ. 1.

Οι βιολογικές ιδιότητες της πουρομυκίνης διαφέρουν από αυτές του

αμινοουκλεοσιδίου της. Έτσι, η πουρομυκίνη είναι γνωστός αναστολέας της σύνθεσης πρωτεϊνών. (18) Αντίθετα το αμινοουκλεοσιδίο (ΑΠ) δεν αναστέλλει την συνθετική ικανότητα ηπατοκυττάρων για πρωτεΐνη. (19, 20) Χαρακτηριστικά επίμυξ που έγιναν νεφρωσικοί μετά χορήγηση ΑΠ παρουσιάζουν 3πλάσιο ρυθμό σύνθεσης λευκωματίνης από τους μάρτυρες. (21)

Στο νεφρό φαίνεται ότι το ΑΠ είναι τοξικό κυρίως για τα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος, τα οποία, όταν εκτεθούν IN VITRO σε ΑΠ παρουσιάζουν φυσαλίδες στην επιφάνειά τους, στραγγυλοποιούνται και αποσπώνται από την πλαστική επιφάνεια του τρυβλίου. Παράλληλα παρουσιάζουν μη αναστρέψιμη ελάττωση της συγκέντρωσης σιαλικού οξέος στην επιφάνειά τους και ελαττωμένη έκκριση θειούχων πρωτεϊνών (πρωτεογλυκάνες) παρά την ενδοκυττάρια άθροιση αυτών των μακρομορίων. Αντίθετα τα μεσαγγειακά κύτταρα δεν φαίνεται να επηρεάζονται αρνητικά από την παρουσία ΑΠ στο θρεπτικό υλικό. (22)

Πειράματα με εμβρυικούς λιθλάστες IN VITRO έχουν δείξει ότι το ΑΠ ελαττώνει την συγκέντρωση του RNA στο κυτταρόπλασμα. Είναι άγνωστο αν αυτό οφείλεται σε αδυναμία μεταγραφής του RNA ή σε αναστολή της μεταφοράς του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. (23) Παραμένει επίσης άγνωστο κατά πόσον τα ευρήματα αυτά ισχύουν και για τα πειραματικά ποδοκύτταρα.

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι έκθεση νεφρών σε ΑΠ για 3 μόνο λεπτά είναι αρκετή για να προκαλέσει τουλάχιστον την οξεία μορφή της σχετικής νεφροπάθειας, όπως δείχθηκε με μεταμόσχευση των εκτεθέντων νεφρών σε υγιείς επίμυξ 3 λεπτά μετά την έγχυση του ΑΠ στην νεφρική αρτηρία. Αντίθετα μεταμόσχευση υγιών νεφρών σε

επίμυε, που είχαν λάβει ΑΠ 24 ώρες νωρίτερα, δεν προκάλεσε αλλοιώσεις στο υγιές μύσκειμα, κύρημα που δεν συνηγορεί με συμμετοχή "χημικού παράγοντος" στην παθολογία της ΝΑΠ. (24)

Η πρώτη περιγραφή νεφρωσικού συνδρόμου από ΑΠ δημοσιεύθηκε το 1955. (25) Από τότε έχουν περιγραφεί ποικίλες παραλλαγές του προτύπου, που σε αδρές γραμμές διακρίνεται σε οξεία και σε χρόνια μορφή ΝΑΠ. Η οξεία μορφή της βλάβης προκαλείται μετά χορήγηση είτε μιας δόσης 60- 150 mg/ kg ενδοφλεβίως (26) είτε μετά 6- 7 ημερήσιες υποδόριες ενέσεις σε δόση 16.7 mg/ kg η κάθε μία. (27) Μετά 6 ημέρες εμφανίζεται πρωτεϊνουρία, η οποία προσδευτικά επιδεινώνεται φθάνοντας νεφρωσικά επίπεδα και μετά βαθμιαία μειώνεται ώστε κατά την 30η ημέρα τα επίπεδα της να είναι ελαφρά μόνο πάνω από το φυσιολογικό. Οι αρχικές ιστολογικές περιγραφές αυτής της φάσης είναι συμβατές με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων (εξάλειψη ποδικών εκβλαστήσεων, σταγονίδια επαναρρόησης πρωτεΐνης στα επιθηλιακά κύτταρα): άλλωστε το πρότυπο αυτό αναπτύχθηκε ακριβώς σαν απομίμηση αυτής της νόσου.

Το 1961 οι FELDMAN & FISHER περιέγραψαν για πρώτη φορά την χρόνια μορφή του προτύπου προσθέτοντας στον πρώτο κύκλο των ημερησίων ενέσεων ΑΠ ένα δεύτερο κύκλο μετά μεσοδιάστημα 7 εβδομάδων. (28) Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε η διατήρηση πρωτεϊνουρίας μέχρι και για 7 μήνες, ενώ η περιγραφή της ιστολογικής εικόνας περιλαμβάνει σαφώς ΕΤΣΣ και διάχυτες, ως επί το πλείστον, αλλοιώσεις των επιθηλιακών κυττάρων. Από τότε έχουν περιγραφεί ποικίλοι τρόποι χορήγησης του ΑΠ για την πρόκληση της χρόνιας αυτής μορφής της ΝΑΠ. (29,30)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (καθώς και σε

εργασίες άλλων ερευνητών παλαιότερα(30) συνίσταται στην χορήγηση 7 υποδόριων ενέσεων 20 mg/ kg σε διάστημα 10 εβδομάδων, έτσι ώστε οι 3 πρώτες δόσεις να είναι εβδομαδιαίες και οι 4 τελευταίες διεβδομαδιαίες. Στις διάφορες μελέτες της χρόνιας NAP από το 1977 και ύστερα έχει περιγραφεί προοδευτικά αυξανόμενη βαρεία πρωτεϊνουρία, εκτεταμένες αλλοιώσεις των σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων με παρουσία πρώιμης ETΣΣ σε ποσοστό 7- 12%, ανάλογα με την συγκεκριμένη μελέτη και την διάρκεια της (12 εβδομάδες τουλάχιστον).

Πρόσφατα επιτεύχθηκε η ανάπτυξη χρόνιας NAP με μία ενδοφλέβια δόση AP 50 mg/ kg. Μετά την υποχώρηση της οξείας φάσης παρατηρείται επανεμφάνιση πρωτεϊνουρίας και 18 εβδομάδες αργότερα διαπιστώνεται ύπαρξη ETΣΣ (31).

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΠΡΟΙΟΥΣΑΣ
ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ**

Πολλά από τα πειραματικά πρότυπα ΕΤΣΣ που περιγράφηκαν έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη διάφορων θεραπευτικών παρεμβάσεων που αποσκοπούν στην πρόληψη ή τουλάχιστον αναστολή παραπέρα εξέλιξης της πρωτεϊνουρίας και των ιστολογικών αλλοιώσεων.

Έτσι έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί οι παρακάτω "θεραπευτικές" παρεμβασεις:

- 1) Δίαιτες με χαμηλά περιεχόμενα πρωτεΐνης.
- 2) Αναστολείς του μετατρέποντος ενδύμου της αγγειοτενσίνης I (ACE-inhibitors ή CEI).
- 3) Παράγωγα ή μοριακά κλάσματα ηπαρίνης.
- 4) Δίαιτες τροποποιημένης περιεκτικότητας σε χοληστερόλη.

Μέχρι τώρα ευρύτερη εφαρμογή είχαν κυρίως οι διάφορες τροποποιήσεις του πρωτεϊνικού περιεχομένου της τροφής και κατά δεύτερο λόγο η χρήση CEI. Έτσι, δίαιτα χαμηλή σε πρωτεΐνη προκαλεί σημαντική βελτίωση των παθολογολογικών και ιστοπαθολογικών εκδηλώσεων στα πρότυπα υφολικής γεφερεκτομής και σακχαρώδη διαβήτη. (12,32) Παρόμοια ευνοϊκή επίδραση στα δύο αυτά πρότυπα έχει αναφερθεί με χρήση Εναλαπρίλης (CEI). (33,15) Ομοίως, σε πρότυπα υφολικής γεφερεκτομής χρήση ηπαρίνης ή τροποποιημένων μοριακών μορφών της φαίνεται να πρόσφερε σημαντική προστασία από την ανάπτυξη των νεφρών μεταβολών. (34)

Ο μηχανισμός ή οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτές οι παρεμβάσεις επιφέρουν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα δεν έχουν ακόμη διευκρινισθεί.

Η "αιμοδυναμική" υπόθεση βασίστηκε σε ευρήματα μικροπαρακέντησεων του σπειράματος σε επίμυς Munich-Wistar, σύμφωνα με τα οποία μετά υφολική νεφρεκτομή, ή πρόκληση σακχαρώδη διαβήτη, αναπτύσσεται ενδοσπειραματική υπέρταση και αύξηση της σπειραματικής διήθησης κατά νεφρώνα (υπερδιήθηση). Όμοια χαμηλότερα πρωτεΐνη είχε σαν αποτέλεσμα βελτίωση τόσο της υπέρτασης όσο και της υπερδιήθησης (12,32), ενώ αναστολή του ACE προκαλούσε ελάττωση της ενδοσπειραματικής πίεσης αλλά όχι της υπερδιήθησης. (32,15) Αόρατο λοιπόν η ερμηνεία ότι η διατήρηση αυξημένων ενδοσπειραματικών πιέσεων προκαλεί μηχανικό τραυματισμό του σπειράματος και οδηγεί στις παθολογικές μεταβολές που έχουν ήδη αναφερθεί. Ετάλλου οι ευεργετικές επιδράσεις των θεραπευτικών μεθόδων υποτίθεται ότι είναι αποτέλεσμα ελέγχου ή βελτίωσης των ενδοσπειραματικών αιμοδυναμικών διαταραχών (35). Πειράματα όμως των τελευταίων δύο ετών στα οποία έγινε δυνατή επανειλημμένη μικροπαρακέντηση των ίδιων σπειραμάτων σε επίμυς μετά υφολική νεφρεκτομή, έδειξαν ότι η εμφάνιση ενδοσπειραματικής υπέρτασης δεν είναι καθολική στους εναπομένοντες νεφρώνες, αλλά ούτε και μόνιμη στον ίδιο νεφρώνα. Επί πλέον δείχθηκε ότι η ανάπτυξη ETSS δεν συνέβαινε κατ'ανάγκη στους νεφρώνες με τις υψηλότερες μέσες διατριχοειδικές πιέσεις (36), ενώ αντίθετα συσχετιζόνταν πολύ καλύτερα με τον βαθμό υπερτροφίας του συγκεκριμένου σπειράματος. (37) Τα πρόσφατα αυτά ευρήματα τείνουν

συνεπώς να μορφοποιήσουν μία "τροφική- αυθητική" υπόθεση σε αντιδιαστολή αυτής των αιμοδυναμικών διαταραχών της υπερδιήθησης (hyperfiltration) και ενδοσπειραματικής υπέρτασης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως αναπτύχθηκε στο γενικό μέρος, η παθογένεια της ΕΤΣΣ καθώς και οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους πειραματικές θεραπείες επιφέρουν βελτίωση έχουν κυρίως μελετηθεί σε πρότυπα όπου προέχουν ή τουλάχιστον συνυπάρχουν αιμοδυναμικές διαταραχές ταυτό της υφολικής νεφροεκτομής και κατά δεύτερο λόγο του σακχαρώδους διαβήτη από στρεπτοδοτακίνη. Η νεφροπάθεια από αμιγνοουκλεοσίδιο της πουρομυκίνης, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι πειραματικό πρότυπο όπου η αρχική βλάβη είναι βιοχημικής/τοξικολογικής φύσης μάλλον παρά αιμοδυναμικής. Συγκεκριμένα, πληροφορίες στην βιβλιογραφία αναφέρουν την διατήρηση χαμηλών ενδοπείραματικών διατοίχευσιδικών πιέσεων τόσο στην οξεία φάση (27), όσο και πολύ πιθανόν στην χρόνια μορφή της ΝΑΠ (38), αν και για την τελευταία υπάρχουν και αντίθετα ευρήματα (39). Άρα το χρησιμοποιηθέν παρασκεύασμα δίνει την δυνατότητα ελέγχου του αποτελέσματος διάφορων θεραπευτικών μεθόδων κάτω από συνθήκες απουσίας ενδοπείραματικής υπέρτασης. Σε προηγούμενη εργασία μας δείξαμε ότι η χορήγηση Εναλαπρίλης σε επίμυε παράλληλα με την χορήγηση του ΑΠ δεν επιφέρει καμία μεταβολή στην βαρύτητα της πρωτεϊνουρίας και στην συχνότητα και ποιότητα των αλλοιώσεων πρώιμης πειραματικής σκλήρυνσης. (40) Με την παρούσα εργασία μελετήθηκε στο ίδιο πρότυπο, αλλά για μακρότερο χρονικό διάστημα και σε τρεις διαφορετικές φάσεις στην εξέλιξη της νόσου, η επίδραση χαμηλής σε πρωτεΐνη διαίτας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣΩΑ, ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΟΟΙ**ΩΩΑ**

Χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες επίμυε Sprague- Dawley, αρσενικού γένυε, που ζύγιζαν 160- 200 g στην αρχή του πειράμωα.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΩΙΕΣ

Το αμινονουκλεοσίδιο της πουρομυκίνης (N6,N6- διμεθυλ- [3'-αμινουό- 3'-δεοξυ]- αδενοσίνη) αγοράσθηκε από την Sigma Chemical co. (St. Louis, Missouri).

ΤΡΟΜΗ

Και τα δύο είδη τροφής (πρωτείνικου περιεχομένου 22.5% και 6%, που θα αναφέρονται παρακάτω σαν "δίαιτα 22.5%" και "δίαιτα 6% αντίστοιχα, αγοράσθηκαν από την εταιρεία Teklad (Madison, Wisconsin). Η πρωτείνη ήταν καζεΐνη και οι δύο δίαιτες ήταν ίσης θερμιδικής αξίας (3.55 kcal/g), είχαν την ίδια περιεκτικότητα σε λίπος (5.5%), ασβέστιο (0.97%), φωσφόρο (0.85%) και μαγνήσιο (0.21%). Η δίαιτα 22.5% περιείχε 51.6% υδατάνθρακες και 6%κυτταρίνη, ενώ η δίαιτα 6% περιείχε 73.2% υδατάνθρακες και 8.2% κυτταρίνη.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΟΟΙ

Η συγκέντρωσηπρωτείνης στα ούρα μετρήθηκε με την μέθοδο του θειοσαλικυλικού οξέω (Sulfosalicylic acid, SSA) (41) και στον ορό με την μέθοδο Lowry. (42) Η συγκέντρωση κρεατινίνης ορού μετρήθηκε με την χρωματομετρική κινητική μέθοδο Jaffe (43) και η συγκέντρωση γαλακτερόλης ορού με ενζυμωτική

μέθοδο προσαρμοσμένη στον αυτόματο αναλυτή Hitachi 737. (44)

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

Μέτρηση συσταλικών αρτηριακών πιέσεων έγινε έμμεσα με την μέθοδο αποκλεισμού της ουράιας αρτηρίας με πιεσόμετρο αεροθαλάμου συνδεδεμένο με καταγραφική συσκευή (Narco Biosystems, Houston, Texas).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΟ

Τα πειραματόζωα διαιρέθηκαν σε 3 ομάδες (Πίνακας 1) και μελετήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολο που απεικονίζεται στα Σχ.2. Οι επίμυες της 1ης ομάδας (24 τον αριθμό) έλαβαν κατά (?) υποδόριες ενέσεις αμινογουκλεοσίδου (ΑΠ, 20 mg/kg, διαλυμένου σε φυσιολογικό ορό, συγκέντρωση 8-9mg/ml). Οι πρώτες τρεις ενέσεις δόθηκαν σε εβδομαδιαία διαστήματα και οι τελευταίες τέσσερις σε διαστήματα δύο εβδομάδων. (30) Τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσληψη νερού και τρέφονταν με την δίαιτα 22.5%.

Οι επίμυες της 2ης ομάδας (24 τον αριθμό) έλαβαν ΑΠ όπως περιγράφηκε πιο πάνω για την 1η ομάδα, είχαν ελεύθερη πρόσληψη νερού, αλλά τρέφοντο με δίαιτα 6%.

Οι επίμυες της 3ης ομάδας (12 τον αριθμό) χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες-για τυχόν μεταβολές λόγω αύξησης της ηλικίας κατά την διάρκεια του πειράματος- και τρέφονταν με δίαιτα 22.5% και είχαν επίσης ελεύθερη πρόσληψη νερού.

Οι αρχικοί προσδιορισμοί περιλάμβαναν μέτρηση της αρτηριακής πίεσης και μετρήσεις απέκκρισης πρωτεΐνης κατά 24ωρο και συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και κρεατινίνης στον ορό (από δείγματα

αίματος που λαμβάνονταν με άποτομή του άκρου της ουράς).

Κατά την διάρκεια του πειράματος η πρωτεΐνη ούρων προσδιορίζονταν κάθε μήνα και πριν από κάθε θυσία. Προσδιορισμοί στον ορό γίνονταν κάθε δύο μήνες και πριν από κάθε θυσία, ενώ η χοληστερόλη μετρήθηκε σε νηστικά ζώα πριν από την τρίτη θυσία σε κάθε ομάδα. Η αρτηριακή πίεση ξαναμετρήθηκε πριν από κάθε θυσία.

Το 1/3 των επιμύων της κάθε ομάδας θυσιάσθηκαν την 12η, 18η και 24η εβδομάδα μετά την έναρξη του πειράματος. Πριν από κάθε θυσία τα ζώα είχαν μείνει νηστικά για 12 τουλάχιστον ώρες. Θυσίες έγιναν υπόνarkωση με αιθέρα, μετά τη λήψη δειγμάτων αίματος, αφαιρέθηκαν άμεσα οι νεφροί, συλλεγήθηκαν χωριστά και ο παραπέρα χειρισμός του κάθε νεφρού έγινε επίσης χωριστά.

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΩΝ

Το μισό κάθε νεφρού (επιμήκης διάτομη) μονιμοποιήθηκε σε αλκοολικό διάλυμα Bouin για 24-36 ώρες, μετά τοποθετήθηκε σε διάλυμα αιθανόλης 70% και στη συνέχεια επεξεργάστηκε παραπέρα κατά τον συνηθισμένο τρόπο. Χρησιμοποιήθηκαν τομές πάχους 2 μm. Από κάθε νεφρό χρησιμοποιήθηκαν 3 τομές, σε απόσταση 200μm η μία από την άλλη για να αποφευχθεί τυχόν εξέταση του ίδιου σπειράματος για περισσότερη από μία φορά. Η χρώση έγινε με Periodic acid Schiff (PAS).

Ιστοτεμάχια για ανοσοφθορισμό εμβαπτίσθηκαν σε ισοπεντάνιο και υποβλήθηκαν σε στιγμασία κατάψυξη με υγρό άζωτο. Χρησιμοποιήθηκαν τομές πάχους 4 μm, που χρώθηκαν κατά την άμεση μέθοδο με αντισώματα σημασμένα με ισοθιοκυανική φθοροσίνη (FITC). Τα

αντισώματα είχαν αναπτυχθεί σε αίμα εναντίον λευκωματίνης, ινωδογόνου, IgM, IgG και συμπληρώματος (C3) επίμυος (από την Cooper Biomedical Inc., Malvern, Pennsylvania). Πριν αποτηνχοση τους η καθαρότητα, η ειδικότητα και η συγκέντρωση αυτών των αντισωμάτων ελιχθηκαν με διπλη ανοσοέλιγωση κατά Dichterlony (45) και με ανοσοηλεκτροφόρηση.

Μικρό τμήμα από τον φλοιό κάθε νεφρού διαιρέθηκε σε κυβικά κομμάτια ακμής 1- 2 mm, μονιμοποιήθηκε σε διάλυμα γλουταραλδεύδης 2,5%, και στη συνέχεια σε διάλυμα τετροξειδίου του Θασίου 1% και επεξεργάστηκε κατά τον καθιερωμένο τρόπο. Τομές πάχους 1μm χρώσθηκαν με κυανού της ταλουιδίνης και εξετάσθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο. Κατόπιν λεπτές τομές χρώσθηκαν με οσικό ουρανύλιο και κιτρικό μόλυβδο και εξετάσθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (11).

Όλα τα επί μέρους μορφολογικά στοιχεία κάθε νεφρού εξετάσθηκαν πλήρως. Επιπρόσθετα, τα σπειράματα εξετάσθηκαν πιο προσεκτικά για υπολογισμό του ποσοστού τους που παρουσίαζε τμηματική σκλήρυνση. Τα στάδια εξέλιξης της αλλοίωσης εκτιμήθηκαν ως εξής. Οι βλάβες των σπειραμάτων διακρίθηκαν σε πρώιμες (σταγονίδια από απορρόφηση πρωτεΐνης και κενοδοπιώδης εκφύλιση των ποδοκυττάρων), ενδιάμεσες (όπως προηγουμένως και επιπλέον ανέυρεση υπεπιθηλιακών άλω ή εγκλωβισμένου πρωτεϊνικού υλικού και κυτταρικών υπολειμμάτων μέσα στον αντίστοιχο τριχοειδικό αυλό) και προχωρημένες (υαλίωση ή κατάρρευση βασικής μεμβράνης με απόφραξη (εξάλειψη) του τριχοειδικού αυλού). Η έκταση κάθε είδους βλάβης εκφράσθηκε ημισοστικά με τα σύμβολα -, +, ++, +++.

Ο αριθμός των πειραμάτων που παρουσίασαν τις παραπάνω μορφές αλλοιώσεων σε κάθε νεφρό εκφράσθηκε σαν ποσοστό του συνόλου των εξετασθέντων πειραμάτων αυτού του νεφρού. Σε κάθε νεφρό εξετάσθηκαν τουλάχιστον 100 πειράματα. Αναλυτικοί πίνακες της αξιολόγησης όλων των νεφρών με την πιο πάνω μεθοδολογία παρατίθενται στο παράρτημα μετά την βιβλιογραφία.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Για την εκτίμηση της πρωτεϊνουρίας, της πρωτεΐνης, κρεατινίνης και της χοληστερόλης στον ορό, καθώς και για τις μετρήσεις αρτηριακής πίεσης χρησιμοποιήθηκε το unpaired Student's t -test. (46) Για τα αποτελέσματα της ιστολογικής μελέτης χρησιμοποιήθηκε το U- test κατά Mann-Whitney για μη παραμετρικές τιμές. (46) Για τον υπολογισμό λήφθηκε υπ' όψη η ιστολογική βαθμολόγηση του κάθε νεφρού χωριστά.

Οι τυχόν διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά αξιόλογες αν η τιμή P ήταν λιγότερο από 0,05. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, standard error of the mean).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ Τα ζώα της 1ης ομάδας (διαιτα 22.5%) είχαν ελαφρά μειωμένη ανάπτυξη σε σύγκριση με τους μάρτυρες (με βάση το βάρος σώματος), ενώ η ανάπτυξη των ζώων της 2ης ομάδας ήταν πολύ μειωμένη σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες. (Σχ. 3)

ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΠΙΕΣΗ

Παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης της συστολικής πίεσης σε όλες τις ομάδες, καθώς η μελέτη εκτελούνταν χρονικά, ιδιαίτερα στην 1η ομάδα (Σχ. 4). Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν έγιναν ποτέ στατιστικά σημαντικές, ενώ οι τιμές πίεσης παρέμειναν μέσα στα φυσιολογικά όρια εκτός από αυτές που μετρήθηκαν κατά την 24η εβδομάδα στην 1η ομάδα (131 ± 7 mmHg).

ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗ ΟΡΟΥ

Στα επίπεδα κρεατινίνης παρατηρήθηκαν διαφορές μεταβολές, αλλά δεν προέκυψαν σταθερές στατιστικά σημαντικές διαφορές (Σχ.5). Γενικά, οι τιμές της 1ης ομάδας έτειναν να είναι υψηλότερες από αυτές των άλλων ομάδων εκτός στις 8 εβδομάδες. Για παράδειγμα στις 24 εβδομάδες η κρεατινίνη ορού της 1ης ομάδας ήταν 1.5 ± 0.2 mg/ dl, της 2ης ομάδας 1.1 ± 0.2 mg/ dl και της 3ης (μάρτυρες) 0.8 ± 0.2 mg/ dl ($p > 0.05$).

ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΟΡΟΥ

Στο πρώτο μισό της μελέτης η συγκέντρωση πρωτεΐνης στον ορό ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα ζώα της 2ης ομάδας σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις της 1ης και 3ης. Στο δεύτερο μισό του πειράματος η διαφορά αυτή εξαφανίσθηκε κυρίως λόγω αύξησης των τιμών στην 2η ομάδα (Σχ.6). Έτσι στις 24εβδομάδες η πρωτεΐνη ορού της 1ης ομάδας ήταν 8.13 ± 0.3 g/ dl, της 2ης ομάδας 8.00 ± 0.52 g/ dl και της 3ης (μάρτυρες) 8.15 ± 0.69 g/ dl.

ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ ΟΡΟΥ

Τα επίπεδα χοληστερόλης στο τέλος του πειράματος (24 εβδομάδες) ήταν σημαντικά υψηλότερα στην 1η ομάδα σε σύγκριση με τις δύο άλλες. Η διαφορά μεταξύ 2ης ομάδας και μαρτύρων δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 2).

ΠΡΩΤΕΪΝΟΥΡΙΑ (Πίνακας 3)

Για τις πρώτες 12 εβδομάδες και οι δύο πειραματικές ομάδες παρουσίαζαν βαρεία -προοδευτικά αυξανόμενη- πρωτεϊνουρία παρ'όλο που στην 2η ομάδα η πρωτεϊνουρία ήταν πάντοτε σημαντικά χαμηλότερη της 1ης. Από την 12η εβδομάδα και μετά, τα ζώα της 2ης ομάδας παρουσίασαν εντυπωσιακή μείωση της πρωτεΐνης ούρων 24 ώρου, που έφθασαν σε επίπεδα πρακτικώς όμοια με των μαρτύρων, ενώ στην 1η ομάδα η πρωτεϊνουρία παρέμεινε αμείωτη ως το τέλος του πειράματος.

ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ- ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Οι νεφροί των επιζώνων της 1ης ομάδας και στις τρεις θυσίες ήταν αυξημένου μεγέθους, υγρά και με κοκκώδη επιφάνεια. Παρόμοια ήταν η μακροσκοπική εμφάνιση των νεφρών της 2ης ομάδας στις 12 εβδομάδες, ενώ στις 18 και 24 εβδομάδες οι νεφροί ήταν μικρότεροι και με πιο λεία επιφάνεια, αν και συνέχιζαν να διαφέρουν από τους νεφρούς των μαρτύρων.

Ο μέσος όρος του βάρους των νεφρών κάθε επίμους διαιρέθηκε με το βάρος σώματος, ώστε να διορθωθούν διαφορές που οφείλονταν στον διαφορετικό βαθμό σωματικής ανάπτυξης στις διάφορες ομάδες (Σχ. 7). Ο λόγος μέσου βάρους νεφρών προς βάρος σώματος ήταν σημαντικά υψηλότερος στις ομάδες 1 και 2 στις 12 εβδομάδες σε σύγκριση με τους μαρτυρές. Στην 2η και ιδιαίτερα στην 3η θυσία παρατηρήθηκε εντυπωσιακή μείωση του λόγου στην 2η ομάδα, που έφθασε στα επίπεδα τιμών των μαρτύρων.

Η συχνότητα ΕΤΣΣ στις διάφορες ομάδες και σε διάφορα χρονικά σημεία παρουσιάζεται στον πίνακα 4. Στις 12 εβδομάδες η ιστοπαθολογική εικόνα των ομάδων 1 και 2 ήταν παρόμοια και μεπιο συχνές τις αλλοιώσεις των επιθηλιακών κυττάρων (σταγονίδια απορρόφησης και μεγάλα κενोटόπια). Προχωρημένες βλάβες (υαλίωση) ήταν σχετικά λίγες στην φάση αυτή (Σχ. 8 και 9).

Στις 18 εβδομάδες και καθώς είχε πλέον σταματήσει η χορήγηση ΑΠ, παρατηρήθηκε εντυπωσιακή βελτίωση της ιστολογικής εικόνας στην 2η ομάδα. Η συχνότητα αλλοιώσεων ήταν πολύ μικρότερη και αυτές ήταν κυρίως του πρώιμου τύπου (βλάβη επιθηλιακών κυττάρων). Αντίθετα, στην 1η ομάδα η συχνότητα αλλοιώσεων δεν μεταβλήθηκε, ενώ από πλευράς βαρύτητας παρουσιάσθηκαν σε πιο προχωρημένο στάδιο

(συνδυασμός επιθηλιακών αλλοιώσεων και υαλίνωσης με συμπυκνμένα τριχοειδή).

Στις 24 εβδομάδες οι νεφροί της 1ης ομάδας παρουσίασαν παραπέρα εξέλιξη των αλλοιώσεων ενώ διατηρήθηκε η βελτίωση στην 2η ομάδα, με λίγες μόνο περιοχές υαλίνωσης (Σχ. 9).

Γενικά παρατηρήθηκε μικρού μόνο βαθμού πολλαπλασιασμός μεσαγγειακών κυττάρων και επέκταση της θεμέλιας ουσίας του μεσαγγείου (σε αντίθεση με τις έντονες επιθηλιακές αλλοιώσεις). Επίσης υπήρχαν υπερμεγέθεις σωληναριακοί κύλινδροι (θετικοί κατά PAS), διευρυμμένα σωληνάρια και στους πιο σοβαρά αλλοιωμένους νεφρούς παρατηρήθηκε εστιακή σωληναριακή ατροφία με λεμφοκυτταρικά διάμεσα διηθήματα που σε ωριμότερες περιπτώσεις είχαν διασπείσει την σωληναριακή βασική μεμβράνη και διεκασώσει ανάμεσα στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα.

Σε όλες τις ομάδες με πρωτεϊνουρία τα ηλεκτρονιομικροσκοπικά ευρήματα ήταν παραπλήσια. Οι ποδικές αποφύσεις των επιθηλιακών κυττάρων ήταν τελείως ή σχεδόν ολοσχερώς επηρεασμένες (Σχ. 10,11). Αντίθετα, στα ζώα της 2ης ομάδας παρατηρήθηκε επανεμφάνιση των ποδίσκων στις 18 και 24 εβδομάδες. Τα υπόλοιπα ηλεκτρονιομικροσκοπικά ευρήματα αντιστοιχούσαν με τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν με το οπτικό μικροσκόπιο σε όλες τις ομάδες στις διάφορες φάσεις του πειράματος.

Μεταξύ των επί μέρους ζώων της κάθε ομάδας υπήρχε σημαντική ιστολογική ανομοιογένεια (Σχ. 12). Παρατηρήθηκε καλή συσχέτιση μεταξύ της βαρύτητας πρωτεϊνουρίας και της μακροσκοπικής εικόνας, του βαθμού σωληναριοδιάμεσων αλλοιώσεων των νεφρών, ενώ η συσχέτιση της πρωτεϊνουρίας με την συχνότητα των

σπειραματικών βλαβών ήταν λιγότερο σαφής.

ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Η κατανομή του ανοσοφθορισμού (για λευκωματίνη, ινική, συμπλήρωμα και IgG) αντιστοιχούσε στις σταγόνες απορρόφησης των επιθηλιακών κυττάρων, με την λευκωματίνη σταθερό επικρατέστερη. Ο ανοσοφθορισμός ήταν εντονότερος στην 1η παράτι στην 2η ομάδα, και στους νεφρούς που ελετάσθηκαν μετά 12 εβδομάδες με μικρή μείωση στις 18 και 24 εβδομάδες.

Αντίθετα η IgM εντοπίσθηκε στο μεσάγγειο σε κοκκώδη κατανομή με ένταση από 1χρη μέχρι 2+, ενώ παρατηρήθηκε προοδευτική αύξηση από τις 12 προς τις 24 εβδομάδες και μία ελαφρή τάση για εντονότερη χρώση στην 1η ομάδα παρά στην δεύτερη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η χρόνια μορφή της ΝΑΠ σε επίμυο με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης δίαιτας χαμηλής σε πρωτεΐνη στην εξέλιξη της νεφρωσικής πρωτεϊνουρίας και ΕΤΣΣ που χαρακτηρίζουν αυτό το μοντέλλο. Οι δίαιτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ισοθερμιδικές και είχαν το ίδιο περιεχόμενο ασβεστίου, φωσφόρου και μαγνησίου, πρόσθετα η περιεκτικότης λίπους καθώς και η ποσοτική τους σύσταση ήταν επίσης πανομοιότυπες. Με τον τρόπο αυτό έγινε προσπάθεια να αποκλεισθούν τυχόν επιδράσεις άλλων διατροφικών παραγόντων στην εξέλιξη της ΝΑΠ. Σχετικά, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι το περιεχόμενο της τροφής σε φωσφόρο, ή θερμίδες παίζει ρόλο στην εξέλιξη χρόνιων νεφροπαθειών προς το τελικό στάδιο. (47,48) Επιπλέον δείχθηκε πρόσφατα ότι αυξημένη περιεκτικότης της τροφής σε χαμητερήν επιδεινώνει τη χρόνια μορφή της ΝΑΠ που προκαλείται από μία δόση Αμινογουκλεασιδίου. (31, 49)

Τα κύρια ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι τα παρακάτω δύο :

1) Εφόσον συνεχίζεται η χορήγηση ΑΠ, η τροποποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου της δίαιτας δεν επηρεάζει σημαντικά την πορεία της νόσου. Και οι δύο πειραματικές ομάδες (1η και 2η) είχαν πρωτεϊνουρία σε νεφρωσικά επίπεδα. Η σημασία της σχετικά ελαφρύτερης πρωτεϊνουρίας της 2ης ομάδας κατά τις 12 πρώτες εβδομάδες είναι αμφίβολη, αφού εξακολουθούσε να παραμένει σε σαφώς παθολογικά επίπεδα και ενώ η ιστολογική εικόνα στις δύο ομάδες δεν διέφερε ούτε ποσοτικά ούτε ποιοτικά. Τα ευρήματα για τις πρώτες 12 εβδομάδες φαίνεται να συμφωνούν με τα αποτελέσματα

προηγούμενης μελέτης μας (40), όπου χορήγηση αναστολέως του ACE (Εναλαπρίλη) δεν μετέβαλε ούτε την πρωτεΐνουρία ούτε την ιστολογική εικόνα της χρόνιας ΝΑΠ κατά τις πρώτες 12 εβδομάδες.

2) Μετά την διακοπή της χορήγησης ΑΠ η χαμηλή σε πρωτεΐνη δίαιτα προκάλεσε, μέσα σε 6 εβδομάδες, δραματική υποχώρηση της πρωτεΐνουρίας σε επίπεδα ουσιαστικά παρόμοια με αυτά των φυσιολογικών μαρτύρων. Η λειτουργική αυτή μεταβολή συνοδεύονταν από βελτίωση της ιστολογικής εικόνας, έτσι ώστε τόσο η συχνότητα όσο και η βαρύτητα των σπειραματικών αλλοιώσεων να είναι ουσιαστικά όμοιες με αυτές των μαρτύρων. Η βελτίωση διατηρήθηκε και μέχρι την 24η εβδομάδα από την έναρξη της χορήγησης ΑΠ, ενώ αντίθετα η εξέλιξη της "νόσου" στην ομάδα 1 συνεχίσθηκε με αμετάβλητο ρυθμό μέχρι και την 24η εβδομάδα.

Πρόσφατα δημοσιεύθηκαν παρόμοια ευνοϊκά αποτελέσματα με χαμηλή σε πρωτεΐνη δίαιτα στον τύπο χρόνιας ΝΑΠ που προκαλείται με μία ένωση αμινογουκλεοσιδίου. (50) Όμως η εξέλιξη αυτού του προτύπου (μία ένωση και ταυτόχρονη έναρξη θεραπευτικών παρεμβάσεων) δεν επιτρέπει την διάκριση ανάμεσα στην δυνατότητα της θεραπευτικής παρέμβασης να προλάβει απλώς την εμφάνιση των παθολογικών αλλοιώσεων, ή να προκαλέσει πραγματική αναστροφή ή σταθεροποίησή τους αφού εμφανισθούν.

Στην παρούσα μελέτη τα πειραματόζωα κάθε ομάδας θυσιάσθηκαν σταδιακά (μετά 12, 18 και 24 εβδομάδες) έτσι ώστε να διερευνηθεί κατά πόσον τυχόν ευεργετική επίδραση της θεραπευτικής παρέμβασης ήταν συνέπεια απλής αναστολής της πορείας της νόσου ή πραγματικής αναστροφής της μορφολογικής βλάβης. Τα αποτελέσματα

επιτρέπουν την ενδιαφερόουσα διαπίστωση ότι η διαιτητική παρέμβαση δεν επέφερε απλώς πρόληψη ή έστω αναστολή της χαρακτηριστικής γι' αυτό το πρότυπο πορείας της νόσου, αλλά είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική αναστροφή της οργανικής βλάβης σε βαθμό που δεν επέτρεπε πλέον την ιστολογική διαφοροποίηση μεταξύ της 2ης ομάδας και των φυσιολογικών μαρτύρων της 3ης ομάδας.

Είναι έτσι φανερό ότι οι πρώιμες βλάβες στην πορεία της ΕΤΣΣ είναι αναστρέψιμες με την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή. Το ακριβές σημείο πέρα από το οποίο οι βλάβες γίνονται μη αναστρέψιμες δεν μπορεί όμως να καθορισθεί με σαφήνεια από την παρούσα μελέτη. Είναι εντούτοις πιθανό ότι ακόμη και η υολινωτική μόδα μέσα στον αυλό των πειραματικών τριχοειδών μπορεί να διαλυθεί. Χαρακτηριστικά, στην ομάδα 2 τέτοιες βλάβες παρατηρήθηκαν σε 5 από 9 νεφρούς μετά 12 εβδομάδες, σε κανένα νεφρό στις 18 εβδομάδες και σε 7 μόνο από 16 νεφρούς στις 24 εβδομάδες.

Η βελτίωση της μορφολογίας των πειραμάτων συνοδεύθηκε και από υποχώρηση των διαμέσων και σωληναριακών αλλοιώσεων καθώς και από άλλες ενδείξεις (βάρος, μέγεθος και αδρή εμφάνιση) αναστροφής της νεφρικής βλάβης. Δεν είναι σαφές, αν αυτό το ευνοϊκό αποτέλεσμα είναι έμμεση συνέπεια της πειραματικής "έλασης" ή αν οφείλεται σε άμεση επίδραση της δίαιτας στις σωληναριακές βλάβες. Το δεύτερο ενδεχόμενο αναφέρεται γιατί υπάρχουν ενδείξεις ότι το περιεχόμενο της τροφής σε πρωτεΐνη έχει ρυθμιστικές επιδράσεις στην αύξηση και στην αναγέννηση του σωληναριακού επιθηλίου. (51) Υπάρχουν επίσης άλλοι πληροφόρητες για ανάλογο ρυθμιστικό ρόλο και της αγγειοτενζίνης II σε σωληναριακά κύτταρα (52).

Οι διαφορές αρτηριακής πίεσης ανάμεσα στις δύο ομάδες δεν είναι τέτοιες που να μπορούν να εξηγήσουν την διαφορά της ιστολογικής εικόνας. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν στους νεφρούς, αρτηριακές ή αρτηριδιακές αλλοιώσεις υπερτασικού τύπου. Η βαρύτητα της πρωτεϊνουρίας συσβάδισε με τις ιστοπαθολογικές μεταβολές και δεν είναι δυνατό να εξηγηθεί από μεταβολές της συγκέντρωσης πρωτεΐνης ορού. Στην 2η ομάδα επίσης άλλου, κατά το δεύτερο μισό του πειράματος όταν η πρωτεϊνουρία υποχώρησε, τα επίπεδα πρωτεΐνης ορού αυξήθηκαν.

Τέλος πρέπει να σημειωθεί και η μείωση της συγκέντρωσης χοληστερόλης στον ορό των επιμύων της 2ης ομάδας σε σύγκριση με αυτών της 1ης. Είναι γνωστό ότι η χρόνια ΝΑΠ συνοδεύεται από υπερχοληστερολαιμία. Από την άλλη πλευρά, ωρισμένες μελέτες έχουν δείξει αυξημένο περιεχόμενο λιπιδίων και κυρίως χοληστερόλης (ελεύθερης και εστεροποιημένης) στις εστιακές σκληρυντικές αλλοιώσεις αυτού του μοντέλλου. (53) Υπενθυμίζεται, επίσης, η αρνητική επίδραση αυθούς της χοληστερόλης στην τροφή πάνω στην πορεία της χρόνιας ΝΑΠ. (49)

Έτσι, η βελτίωση των επιπέδων χοληστερόλης στα ζώα της 2ης ομάδας αν και μπορεί να είναι απλώς ένδειξη βελτίωσης του νεφρωσικού συνδρόμου, μπορεί όμως και να συνέβαλε στην βελτίωση των ιστολογικών αλλοιώσεων αλλά και των λειτουργικών διαταραχών.

Η παρούσα μελέτη δεν μπορεί να εξηγήσει τον μηχανισμό με τον οποίο ο περιορισμός της πρωτεΐνης στην τροφή επιφέρει την βελτίωση της "νόσου". Τα ευρήματα θα μπορούσαν να αποδοθούν σε ευεργετική επίδραση της χαμηλής ~~α~~ πρωτεϊνότητας πάνω στην ενδοπειραματική, τριχοειδική πίεση και στην διήθηση κατά

γεφρώνα. (12) Εν τούτοις, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η ενδοσπειραματική αιμοδυναμική της χρόνιας ΝΑΠ δεν είναι διασπασμένη. Μία μελέτη αναφέρει αυξημένες ενδοσπειραματικές τριγαιδικές πιέσεις 9 εβδομάδες μετά πρόκληση ΝΑΠ με μία δόση. (39) Αντίθετα σε άλλη μελέτη, επανειλημμένες μετρήσεις στα ίδια σπειράματα σε διάστημα οκτώ εβδομάδων έδειξαν φυσιολογικές ή χαμηλές ενδοσπειραματικές πιέσεις. (38) Εξ άλλου παρόμοια αποτελέσματα και σε άλλα μοντέλλα ΕΤΣΙ έχουν αρχίσει να προκαλούν αμφισβητήσεις για την πραγματική σημασία της σπειραματικής αιμοδυναμικής στην παθολόγηση της ΕΤΣΙ. (36) Πρόσφατα προτάθηκε μία εναλλακτική άποψη που προσπεύει ότι η πρόκληση ΕΤΣΙ καθορίζεται κυρίως από τον βαθμό της προηγούμενης σπειραματικής υπερτροφίας. (37) Αδημοσίευτες παρατηρήσεις μας έδειξαν παρόμοιες, αν και λιγότερα ισχυρές, επιδράσεις αναστολής του ACE με Ενυλακρίλη στην πορεία της ΝΑΠ, 18 και 24 εβδομάδες μετά την διακοπή χορήγησης του αμινουκλεοσιδίου. (8)

Τα παραπάνω ευρήματα μαζί με την πρόσφατη έμφαση στον ρόλο της υπερτροφίας του σπειράματος σαν καθοριστικού παράγοντα ΕΤΣΙ, είναι συμβατά με την υπόθεση ότι τόσο η μειωμένη πρόσληψη πρωτεΐνης όσο και η αναστολή της σύνθεσης αγγειοτασίνης II δρουν, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω ενός κοινού μηχανισμού αναστολής τροφικών και αναγεννητικών διεργασιών στα

(8) Αυτά τα ευρήματα δεν βρίσκονται σε πραγματική αντίθεση με εκείνα της προηγούμενης εργασίας μας (40), όπου η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της αναστολής του ACE έγινε μόνο στις 12 εβδομάδες, δηλαδή σχεδόν αμέσως μετά την διακοπή του αμινουκλεοσιδίου.

"τραυματισμένα" σπειράματα η και σωληνάρια. Εναλλακτικά, είναι ενδεχόμενο η μείωση πρωτεΐνης στην τροφή να δρα μέσω μεταβολών στα ιστικά επίπεδα αγγειοτενζίνης II.

Προς ενίσχυση της παραπάνω υπόθεσης αναφέρεται ότι :

1. τα περιεχόμενα της τροφής σε πρωτεΐνη σχετίζεται σε επίμυθετικά με την δραστηριότητα ρενίνης πλάσματος (PRA), την συγκέντρωση αγγειοτενζίνης I, αλδοστερόνης και αγγειοδιασταλτικών προσταγλανδινών και τον βαθμό νεφρικής υπερτροφίας (51) και

2. ότι η αγγειοτενζίνη II επαυξάνει την μιτωτική δράση του επιδερμικού αυθητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) σε σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro*. (52)

Άλλοι μηχανισμοί επίδρασης της μειωμένης πρόσληψης πρωτεΐνης στην εξέλιξη της ΕΤΣΣ θα ήταν δυνατόν να αναζητηθούν σε μεταβολές στα επίπεδα νεφρικών προσταγλανδινών (51, 52), μείωση της οξειδωτικής επιβάρυνσης (oxidant stress) κατά νεφρώνα (54), ή μειωμένη συγκέντρωση άλλων αυθητικών παραγόντων.

Συνεπώς είναι πιθανόν ότι στην χρόνια NAPI η χαμηλή πρόσληψη πρωτεΐνης μειώνοντας την δραστηριότητα του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενζίνης στον νεφρό (και πιθανώς και με άλλους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν) ελαττώνει τις υπερτροφικές/ αναγεννητικές ενέργειες των τραυματισμένων ποδοκυττάρων και πιθανώς και μεσαγγειακών κυττάρων. Έτσι, εάν όντως υπάρχει σχέση μεταξύ υπερτροφίας και σκλήρυνσης του σπειράματος, θα μπορούσε να

ερμηνευθεί η δραματική υποχώρηση της σκληρυντικής λειτουργίας που παρατηρήσαμε.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενισχύουν το ενδεχόμενο ότι περιορισμός της πρόσληψης πρωτεΐνης θα μπορούσε να προκαλέσει διακοπή ή και αναστροφή των αυτατροφοδοτούμενων μηχανισμών νεφρικής βλάβης σε κλινικές νεφροπάθειες με ΕΤΣΣ, υπό την προϋπόθεση ότι το αρχικό αίτιο της πειραματικής βλάβης έχει πάψει να επιδρά. Χαρακτηριστικά, στο πειραματικό πρότυπο που χρησιμοποιήσαμε η ευεργετική επίδραση του περιορισμού προσλαμβανόμενης πρωτεΐνης ήταν συνάρτηση τόσο του έγκαιρου της διαιτητικής παρέμβασης όσο και της διακοπής της νεφροτοξικής επίρροης του αμινοουκλινισιδίου της πουρομυκίνης (δηλαδή του αιτίου πειραματικής βλάβης).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη διετάσθηκαν οι επιδράσεις του πρωτεϊνικού περιεχομένου της τροφής στην πορεία της χρόνιας νεφροπάθειας από αμινοουκλεασίδια της πουργομυκίνης (NAP). Η NAP προκλήθηκε σε αρσενικούς επίμυς Sprague-Dawley με 7 υποδόριες ενέσεις αμινοουκλεασιδίου (ΑΠ) (20 mg/kg σε διάστημα 10 εβδομάδων), οι οποίοι διαιρέθηκαν σε τρεις ομάδες: με πρωτεϊνικό περιεχόμενο διαίτας 22.5% (ομάδα 1), 6% (ομάδα 2), και μάρτυρες (3η ομάδα): διαίτα 22.5%, χωρίς χορήγηση ΑΠ). Οι δύο διαίτες ήταν ισοθερμιδικές και με το ίδιο περιεχόμενο φωσφόρου και χοληστερόλης. Επίμυς από κάθε ομάδα θυσιάσθηκαν στις 12, στις 18 και στις 24 εβδομάδες.

Η πρωτεϊνουρία ήταν σημαντικά μικρότερη στην ομάδα 2 απ' ότι στην ομάδα 1 καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος, αλλά η διαφορά έγινε εξαιρετικά έντονη μετά την 12η εβδομάδα. (135±15 έναντι 299±37 mg/ημ., $p < 0.05$, 20±4 έναντι 240±35 mg/ημ. μετά 18 εβδομάδες, $p < 0.05$, και 25±8 έναντι 209±29 mg/ημ. μετά 24 εβδομάδες, $p < 0.05$). Οι τιμές κρεατινίνης ορού ήταν ψηλότερες στην ομάδα 1 απ' ότι στην 2, αλλά η διαφορά υπήρξε στατιστικά σημαντική μόνο στις 18 εβδομάδες (1.1 ± 0.3 έναντι 0.8 ± 0.1 mg/dl, $p < 0.05$).

Τα επίπεδα χοληστερόλης ορού ήταν σημαντικά ψηλότερα στην ομάδα 1 στις 24 εβδομάδες (286 ± 20 έναντι 148 ± 24 της ομάδας 2 και 101 ± 2 mg/dl των μαρτύρων).

Πρώιμες βλάβες εστιακής τμηματικής πειραματικής σκλήρυνσης (ETIS) παρατηρήθηκαν με παρόμοια συχνότητα κατά την 12η εβδομάδα και στις δύο ομάδες (16% έναντι 15% και 1.5% των μαρτύρων), αλλά κατά την 18η εβδομάδα

διαπιστώθηκε αναστροφή της ΕΤΣΣ στην 2η ομάδα (3% έναντι 14% της ομάδας 1), διαφορά που διατηρήθηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (18% (ομάδα 1) έναντι 5% (ομάδα 2).

Συμπερασματικά, εφ' όσον διακοπεί η χορήγηση αμινογλουκωσιδίου περιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου της τροφής για 24 εβδομάδες αναστρέφει τόσο την πρωτεϊνουρία όσο και την πρώιμη ΕΤΣΣ, που χαρακτηρίζουν την χρόνια ΝΑΠ.

SUMMARY

The effects of dietary protein on chronic puromycin aminonucleoside nephropathy (PAN) were studied. PAN was induced with seven SQ injections of puromycin aminonucleoside (PA) 20 mg/kg over 10 weeks in male Sprague-Dawley rats. Animals were divided into a 22.5% protein diet group (Gr 1), and a 6% protein diet group (Gr 2), whereas group 3 animals, ingesting the group 1 diet, served as age-matched controls. Both diets were isocaloric and had the same phosphorus and cholesterol content. Rats from each group were sacrificed at 12, 18 and 24 weeks.

Proteinuria was significantly less in Gr 2 vs. Gr 1 at all times and this difference became very prominent after 12 weeks ($\bar{x} \pm \text{SEM} = 299 \pm 7$ vs. 135 ± 15 mg/day at 12 weeks, $p < 0.05$, 240 ± 35 vs. 20 ± 4 at 18 weeks, $p < 0.05$, 209 ± 29 vs. 25 ± 8 at 24 weeks, $p < 0.05$).

Serum creatinine was higher in Gr 1 vs. Gr 2 but this difference was significant only at 18 weeks (1.1 ± 0.3 vs. 0.8 ± 0.1 , $p < 0.05$). Serum cholesterol was significantly higher in Gr 1 vs. Gr 2 at 24 weeks (286 ± 20 vs. 148 ± 24 vs. 101 ± 2 mg/dl in controls, $p < 0.05$). Early lesions of focal segmental glomerular sclerosis/hyalinosis (FSH) were equally present in Gr 1 and Gr 2 at 12 weeks (16% vs. 15% vs. 1.5% in controls), but by 18 weeks a reversal in FSH was seen in Gr 2 (3% vs. 14% in normal protein diet group), which persisted up to the end of the study (18% vs. 5% in Gr 1 vs. Gr 2).

In conclusion, after cessation of PA injections low protein diet for 24 weeks reversed both proteinuria and early FSH lesions in chronic PAN.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. TISHER CC, MADSEN KM : Anatomy of the Kidney
 Κεφάλαιο 1 στο "The Kidney" από τους BRENNER BM
 και RECTOR FC, εκδότης W.B. SAUNDERS CO.
 3η έκδοση 1986, σελ. 9-16.
2. ZAMBONI L : Anatomy and Embryology of the Kidney
 Κεφάλαιο 1 στο "Textbook of Nephrology" από τους
 MASSRY SG, GLASSOCK RJ., εκδότης WILLIAMS AND
 WILKINS, 1983, σελ. 1.4-1.12.
3. MANCILA-JIMENEZ P., BELLON B., KUHN J., BELAIR M.,
 ROUCHON M., DRUET P., BARIETY J., : Phagocytosis of
 heat-aggregated Immunoglobulins by Mesangial Cells,
 Lab. Invest. 46, 243, 1982.
4. SCHREINER GF., UNANUE ER. : Origin of the rat mesangial
 phagocyte and its expression of the leukocyte common
 antigen, Lab. Invest. 51, 515, 1984.
5. HOSTETTER T.H., BRENNER BM. : Determinants of the
 glomerular filtration of macromolecules.
 Κεφάλαιο 4 στο "Textbook of Nephrology" από τους
 MASSRY SG, GLASSOCK RJ., εκδότης WILLIAMS and WILKINS,
 1983, σελ. 1.39-1.41.
6. BRENNER BM., DWORKIN L. D., ICHIKAWA I. : Glomerular
 ultrafiltration, Κεφάλαιο 4 στο "The Kidney"
 από τους BRENNER BM., RECTOR FC., εκδότης W.B.SAUNDERS
 CO, 3η έκδοση, 1983, σελ.124-138.

7. GLASSOCK RJ., ADLER SG., WARD HJ., COHEN AH. :
 Focal glomerular sclerosis, Κεφάλαιο 22 (Primary
 glomerular diseases) στο "The kidney" στο τους
 BRENNER BM., RECTOR FC., εκδότρια W.B. SAUNDERS CO.,
 3η έκδοση, 1983, σελ. 974-978.

8. BORDER WA : Distinguishing minimal change disease from
 mesangial disorders (Nephrology Forum), Kidney Intern.
 34, 419, 1988.

9. THOENES W, RUMPELT HJ : The obsolescent renal
 glomerulus. Virchows Arch. A, 377, 1, 1977.

10. HABIB R : Focal glomerular sclerosis (Editorial), Kidney
 Intern. 4, 355, 1973.

11. COHEN AH, MAMPASO F, ZAMBONI L : Glomerular Podocyte
 degeneration in Human Renal Disease. Lab. Invest. 37,
 30, 1977.

12. OLSON JL, HOSTETTER TM, RENNIG HG, BRENNER BM,
 VENKATACHLAM MA : Altered glomerular permselectivity
 and progressive sclerosis following extreme ablation
 of renal mass. Kidney Intern. 22, 112, 1982.

13. KASHGARIAN M : Mesangium and glomerular disease.
 (Editorial). Lab. Invest. 52 : 569, 1985.

14. STERZEL RB, LOVETT DH, STEIN HD, KASHGARIAN M :
 The mesangium and glomerulonephritis. Klin.
 Wochenschrift 60 : 1077, 1982.

15. ZATZ R, DUNN BR, MEYER TW, ANDERSON S, RENNIG HG,
 BRENNER BM : Prevention of Diabetic glomerulopathy by
 Pharmacological amelioration of glomerular capillary

- hypertension, J. Clin. Invest. 77, 1925, 1986.
16. OKUDA S, OH Y, TSURUDA H, ONOYAMA K, FUJIMI S, FUJISHIMA M : Adriamycin- induced nephropathy as a model of chronic progressive disease. Kidney Intern. 29 : 502, 1986.
17. BERTANI T, POGGI A, POZZONI R, DELAINI F, SACCHI G, THOUA Y, MECCA G, REMUZZI G, DONATI MB : Adriamycin- induced nephrotic syndrome in rats. Lab. Invest. 46, 16, 1982.
18. NATHANS D, NEIDLE A : Structural requirements for puromycin inhibition of protein synthesis, Nature 197, 1076, 1963.
19. GORDON P.B, SEGLEN P.O. : 6- Substituted Purines : A novel class of inhibitors of endogenous protein degradation in isolated rat hepatocytes. Arch. Bioch. Biophys. 217, 282, 1982.
20. DECKER K, FRANZ HE, FRANZ M : Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Puromycin und Aminonucleosid auf die Proteinsynthese. Klin. Wochenschr. 42, 583, 1964.
21. MIZUNO NS, DERR RF : Liver RNA in Aminonucleoside Nephrosis in rats. Life Sciences 10 (II), 781, 1971.
22. FISHMAN JA, KARNOVSKY MJ : Effects of the Aminonucleoside of Puromycin on Glomerular Epithelial Cells in Vitro. Am. J. Pathol. 118, 398, 1985.
23. CHOLON JJ, STUDZINSKI GP : Metabolic differences between normal and neoplastic cells : Effects of

- Aminonucleoside on Cytoplasmic Messenger RNA. Science 184, 160, 1973.
24. HOYER JR, RATTE J, POTTER AH, MICHAEL AF : Transfer of Aminonucleoside Nephrosis by Renal Transplantation. J. Clin. Invest. 51, 2777, 1972.
25. FRENK S, ANTONOWICZ I, CRAIG JM, METCALF J : Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside renal lesions and body electrolyte composition. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 89, 424, 1955.
26. RYAN GB, KARNOVSKY MJ : An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. Kidney Intern. 8, 219, 1975.
27. BOHRER MP, BAYLISS C, ROBERTSON CR, BRENNER BM : Mechanisms of the Puromycin- induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. J. Clin. Invest. 60, 152, 1977.
28. FELDMAN JD, FISHER ER : Chronic Aminonucleoside Proteinuria. Lab. Invest. 10, 444, 1961.
29. GLASSER RJ, VELOSA JA, MICHAEL AF : Experimental Model of Focal Sclerosis, Lab. Invest. 36, 519, 1977.
30. GROND J, WEENING JJ, ELEMA JD : Glomerular Sclerosis in Nephrotic rats. Lab. Invest. 51, 277, 1984.
31. DIAMOND JR, KARNOVSKY MJ : Focal and Segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of Puromycin Aminonucleoside. Am. J. Pathol. 122, 481, 1986.
32. ZATZ R, MEYER TW, RENNKE HG, BRENNER BM : Predominance

of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5963, 1985.

33. MEYER TW, ANDERSON S, RENNKE HG, BRENNER BM : Converting enzyme inhibitor therapy limits progressive glomerular injury in rats with renal insufficiency. Am. J. Med. 79 (Suppl.3C), 31, 1985.

34. PURKERSON ML, TOLLEFSEN DM, KLAHR S : N- Desulfated/ Acetylated Heparin ameliorates the progression of renal disease in rats with subtotal renal ablation. J. Clin. Invest. 81, 69, 1988.

35. HOSTETTER TH, RENNKE HG, BRENNER BM : Compensatory renal hemodynamic injury : A final common pathway of residual nephron destruction. Amer. J. Kidney Dis. 1, 310, 1982.

36. YOSHIDA Y, FOGO A, SHIRAGA H, GLICK AD, ICHIKAWA I : Serial micropuncture analysis of single nephron function in subtotal renal ablation. Kidney Intern. 33, 855, 1988.

37. YOSHIDA Y, FOGO A, ICHIKAWA I : Glomerular hypertrophy has a greater impact on glomerular sclerosis than the adaptive hyperfunction in remnant nephrons (Abstract). Kidney Int. 33, 327, 1988.

38. ANDERSON S, DIAMOND JR, KARNOVSKY MJ, BRENNER BM : Glomerular hypertension : A maladaptation of recovery from acute glomerular injury (Abstract). Kidney Intern. 31, 379, 1987.

39. FOGO A, YOSHIDA Y, KIKUCHI T, GLICK A, ICHIKAWA I : Serial micropuncture analysis of the same nephrons in

- chronic renal disease : Studies in two rat models of glomerular sclerosis (Abstract) *Kidney Intern.* 31, 384, 1987.
40. MARINIDES GN, GROGGEL GC, COHEN AH, COOK T, BARANOWSKI RL, WESTENFELDER C, BORDER WA : Failure of angiotensin converting enzyme inhibition to affect the course of chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *Am. J. Pathol.* 129, 394, 1987.
41. HENRY RJ, CANNON DC, WINKLEMAN JW : *Clinical Chemistry : Principles and Technics*, Harper and Row, Hagerstown, MD, 2nd edition (1974), p. 434- 435.
42. LOWRY OH, ROSENBOUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
43. HENRY RJ, CANNON DC, WINKLEMAN JW : *Clinical Chemistry : Principles and Technics*, Harper and Row, Hagerstown, MD, 2nd edition (1974), p. 543- 552.
44. ALLAIN CC, POON LS, CHAN CSG, RICHMOND W, FU PC : Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20, 470, 1974.
45. DUCHTERLONY O, NILSSON LA : Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Handbook of experimental Immunology*, από DM Wetr, Εκδόσεις Blachwell, σελ. 19.1, 1978.
46. SNEDECOR GM, COCHRAN WG : *STATISTICAL METHODS* 6η έκδοση, Amer. Iowa State University Press 1967, σελ. 130.
47. KARLINSKY ML, HAUT L, BUDDINGTON B, SHMER NA, ALFREY AC :

- Preservation of renal function in experimental glomerulonephritis. *Kidney Intern.* 17, 293, 1980.
48. TAPP D, WORTHAM W, ADDISON J, BARNES J, VENKATACHALAM MA : Calorie restriction retards the progression of chronic renal failure in rats (Abstract). *Kidney Intern.* 33, 386, 1988.
49. DIAMOND JR, KARNOVSKY MJ : Exacerbation of chronic aminonucleoside nephrosis by dietary cholesterol supplementation. *Kidney Intern.* 32, 671, 1987.
50. DIAMOND JR, KARNOVSKY MJ : Ameliorative effects of dietary protein restriction in chronic aminonucleoside nephrosis. *J. LAB. CLIN. MED.* 109, 538, 1987.
51. PALLER MS, HOSTETTER TH : Dietary protein increases plasma renin and reduces pressor reactivity to angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 251, F34, 1986.
52. NORMAN J, BADIE-DESFOOLLY B, NORD EP, KURTZ I, SCHLOSSER J, CHAYDAKI A, FINE LG : EGF- induced mitogenesis in proximal tubular cells : Potentiation by angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 253, F299, 1987.
53. GROND J, GOOR HV, ERKELENS DW, ELEMA JD : Glomerular sclerotic lesions in the rat : Histochemical analysis of their macromolecular and cellular composition. *VIRCHOWS ARCHIV B*: 51, 521, 1986.
54. NATH KA, CRDATT AJ, HOSTETTER TH : Effect of dietary protein restriction on oxygen consumption and oxidant stress in the remnant nephron (Abstract). *Kidney*

Intern. 33, 381, 1988.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

1η ΟΜΑΔΑ: (n=24)	-ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΜΙΝΟΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΟΥ -ΔΙΑΙΤΑ 22.5%
2η ΟΜΑΔΑ: (n=24)	-ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΜΙΝΟΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΟΥ -ΔΙΑΙΤΑ 6%
3η ΟΜΑΔΑ: (n=12)	-ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΝΟΣΟΥ -ΔΙΑΙΤΑ 22.5%

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΧΩΝΗΣΤΕΡΟΝΗ ΟΡΟΥ
ΚΑΤΑ ΤΗΝ 3η ΒΥΣΙΑ
(24η ΕΒΔΟΜΑΔΑ)

1η ΟΜΑΔΑ : (δύσλιτα 22.5%)	286 ± 20 mg/ dl
2η ΟΜΑΔΑ : (δύσλιτα 6%)	148 ± 24 mg/ dl
3η ΟΜΑΔΑ : (μάρτυρες)	101 ± 2 mg/ dl

$p < 0.05$ μεταξύ 1ης ΟΜΑΔΑΣ και των άλλων
δύο ομάδων.

$p > 0.05$ μεταξύ 2ης ΟΜΑΔΑΣ και μαρτύρων.
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως $\bar{x} \pm SEM$.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 : ΠΡΩΤΕΙΝΟΥΡΙΑ
($\bar{x} \pm \text{SEM}$ σε mg/ 24ωρο)

	1n ΟΜΑΔΑ	2n ΟΜΑΔΑ	3n ΟΜΑΔΑ
ΒΑΣΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ	2.4 \pm 0.3	3.5 \pm 0.5	3.2 \pm 0.5
4n ΕΒΔΟΜΑΔΑ	125 \pm 11*	75 \pm 10**	10 \pm 2
8n ΕΒΔΟΜΑΔΑ	292 \pm 33*	151 \pm 20**	17 \pm 2
12n ΕΒΔΟΜΑΔΑ	299 \pm 37*	135 \pm 15**	16 \pm 2
18n ΕΒΔΟΜΑΔΑ	240 \pm 35*	20 \pm 4	14 \pm 3
21n ΕΒΔΟΜΑΔΑ	278 \pm 44*	17 \pm 7	19 \pm 3
24n ΕΒΔΟΜΑΔΑ	209 \pm 29*	25 \pm 8	24 \pm 3

* $p < 0.05$ μεταξύ 1ης και 2ης ΟΜΑΔΑΣ, επίσης μεταξύ 1ης και 3ης ΟΜΑΔΑΣ.

** $p < 0.05$ μεταξύ 2ης και 3ης ΟΜΑΔΑΣ.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4 : ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ (ΕΤΣΣ)
($\bar{x} \pm \text{SEM}$)**

	1η ΟΜΑΔΑ	2η ΟΜΑΔΑ	3η ΟΜΑΔΑ
12 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ	16 \pm 1.2% (n=6)	15 \pm 1.3% (n=5)	1.3 \pm 0.4%* (n=3)
18 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ	13.6 \pm 1.5% (n=6)	3.3 \pm 1.6%** (n=7)	1.5 \pm 0.0%* (n=2)
24 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ	18.1 \pm 2.6% (n=7)	5.4 \pm 2.5%** (n=8)	0.6 \pm 0.5%* (n=4)

* $p < 0.05$ από την 1η ΟΜΑΔΑ.

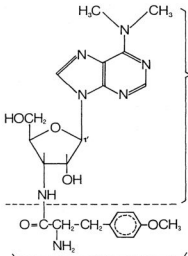
** $p < 0.05$ 2η ΟΜΑΔΑ κατά την 18η και 24η ΕΒΔΟΜΑΔΑ σε σύγκριση προς την 12η ΕΒΔΟΜΑΔΑ.

ΥΠΟΤΙΤΛΟΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ

- Σχήμα 1 : Συντακτικοί τύποι πουραμυκίνης, αμινογουκλεοσιδίου της πουραμυκίνης και 2'-δεοξυ-οδεννοσίνης.
- Σχήμα 2 : Πειραματικό πρωτόκολλο. Οι 7 εντάσεις αμινογουκλεοσιδίου συμπληρώθηκαν μέσα σε 10 εβδομάδες. Οι διαλεπτικές παρεμβάσεις άρχισαν με την αρχή του πειράματος και συνεχίστηκαν μέχρι τον χρόνο θυσίας του κάθε πειραματόζωου (δηλαδή 12 ή 18 ή 24 εβδομάδες μετά την έναρξη του πειράματος).
- Σχήμα 3 : Βάρος σώματος επιμύων κατά ομάδες και κατά διάφορα χρονικά σημεία στην εξέλιξη του πειράματος. Το βάρος εκφράζεται σε γραμμάρια ως μέσος όρος και τυπική απόκλιση του μέσου όρου (mean and standard error of the mean χ +SEM).
- Σχήμα 4 : Συσταλική αρτηριακή πίεση κατά ομάδες στην διάρκεια της μελέτης. Εκφραση σε mmHg (ως χ +SEM).
- Σχήμα 5 : Επίπεδα κρεατινίνης ορού κατά ομάδες στην διάρκεια της μελέτης. Εκφραση σε mg/dl, ως χ +SEM).
- Σχήμα 6 : Επίπεδα αλικής πρωτεΐνης ορού κατά ομάδες στην διάρκεια της μελέτης. Εκφραση σε g/dl, ως χ +SEM.
- Σχήμα 7 : Λόγος βάρους νεφρών προς βάρος σώματος κατά ομάδες κατά τις τρεις θυσίες. Εκφραση σε g/kg, ως χ +SEM.
- Σχήμα 8 : Φωτομικρογραφίες με χαρακτηριστικά δείγματα
 Α) Πρώιμη βλάβη (υπερπλασία ποδοκυττάρων, σταγονίδια απορρόφησης, κενοδοπιώδη εκφύλιση).
 Β) Ενδιάμεση βλάβη (αδρή κενοδοπιώδη εκφύλιση, περιόχες αρχόμενης υαλίνωσης, μικρού βαθμού αύξηση του μεσαγγειακού χώρου).
 Γ) Προχωρημένη βλάβη (σημαντική απώλεια τριχοειδικών αυλών από υαλινωτικές αλλοιώσεις και από αύξηση υλικού βασικής μεμβράνης - μεσαγγείου, συμφύσεις προς την κόψα του Bowman). (Χρώση PAS, χ 200).
- Σχήμα 9 : Φωτομικρογραφίες με χαρακτηριστικά δείγματα από τις τρεις πειραματικές ομάδες κατά την 3η θυσία (24η εβδομάδα).
 Α : Πειράματα από επίμυ της 1ης ομάδας
 Β : Πειράματα από επίμυ της 2ης ομάδας
 Γ : Πειράματα από φυσιολογικό επίμυ (3η ομάδα).
- Σχήμα 10 : Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία σπειρώματος επίμυος της 2ης ομάδας (πρωτεΐνης 6%) κατά την 1η θυσία (12 εβδομάδες). Παρατηρείται

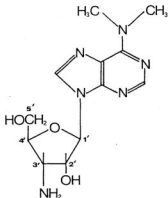
σχεδόν πλήρης επιπέδωση ποδικών αποφύδων των επιθηλιακών κυττάρων (χ 16250).

- Σχήμα 11 : Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία από επίφυ της 2ης ομάδας κατά την 3η θέση (24 εβδομάδες). Οι ποδικές αποφύδες παρουσιάζουν φυσιολογική όψη.
- Σχήμα 12 : Συχνότητα κατ'ακτής πειραματικής σκλήρυνσης κατά πειραματόζωο. Είναι φανερό η ανομοιογένεια του βαθμού σκλήρυνσης ανάμεσα σε διάφορα ζώα της ίδιας ομάδας.



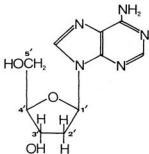
p - μεθοξυ - φαινυλαλανίνη

Το συνολικό μόριο της ·πουρομικίνης



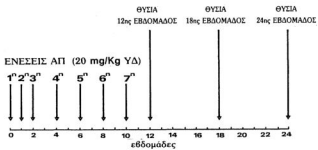
Το αμινοουκλεοσίδιο της
πουρομικίνης (N⁶, N⁶-
διμεθύλ [3' - αμινο - 3'
δεοξυ]- αδενοσίνη)

Για σύγκριση παρατίθεται το μόριο της 2' - δεοξυ- αδενοσίνης, που είναι ένα από τα φυσιολογικά νουκλεοσίδια του μορίου του DNA:



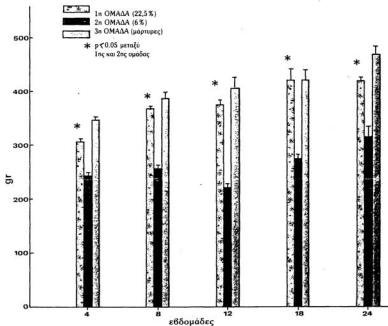
Συντακτικοί τύποι
πουρομικίνης,
αμινοουκλεοσίδιο
της πουρομικίνης και
2' - δεοξυ - αδενοσίνης

ΣΧΗΜΑ 1



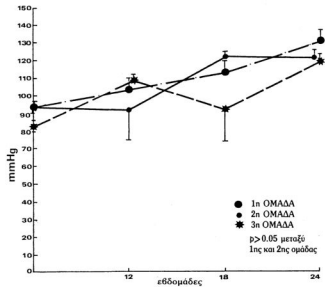
ΣΧΗΜΑ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ



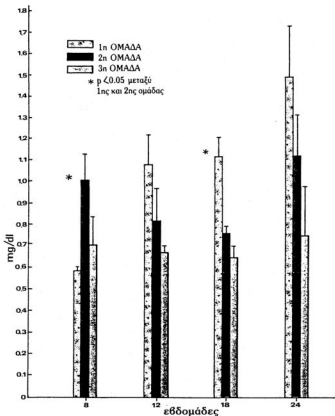
ΣΧΗΜΑ 3

ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ ($\bar{X} \pm SEM$)



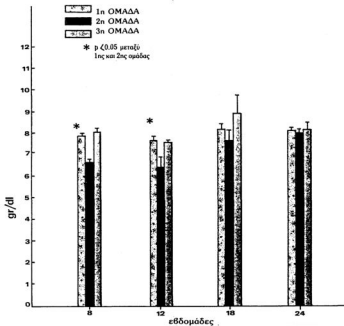
ΣΧΗΜΑ 4

ΣΥΣΤΟΛΙΚΕΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΕΣ ΠΙΕΣΕΙΣ ($\bar{X} \pm \text{SEM}$)



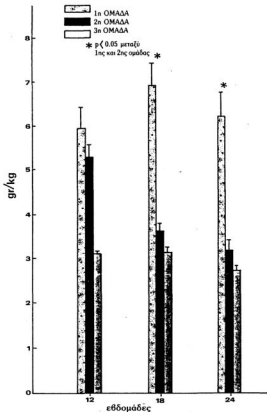
ΣΧΗΜΑ 5

ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗ ΟΡΟΥ ($\bar{X} \pm SEM$)



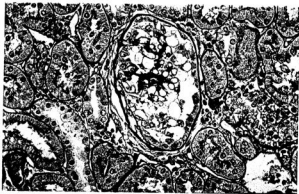
ΣΧΗΜΑ 6

ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΟΡΟΥ ($\bar{X} \pm \text{SEM}$)

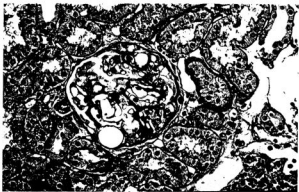


ΣΧΗΜΑ 7

ΛΟΓΟΣ ΒΑΡΟΥΣ ΝΕΦΡΩΝ προς ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ ($\bar{X} \pm SEM$)



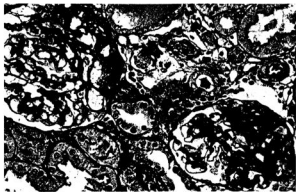
8α



8β



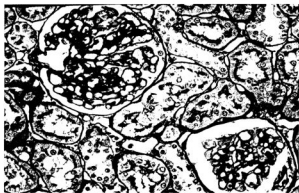
8γ



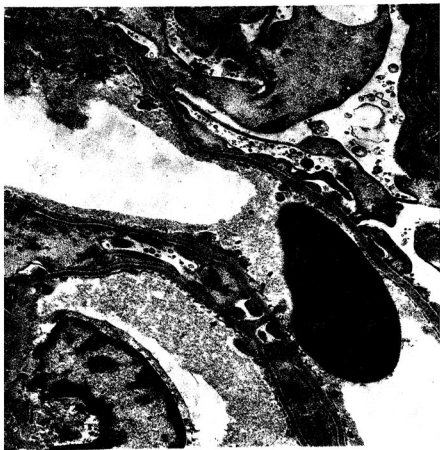
9a



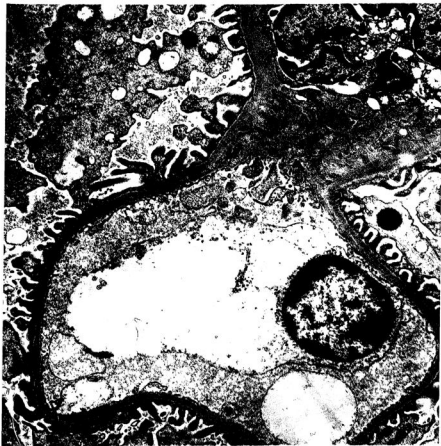
9b



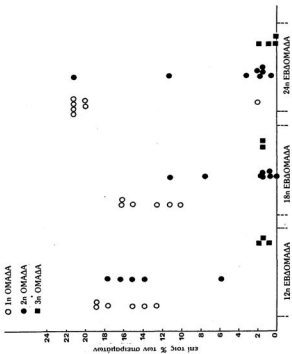
9c



Σ_x 10



$\Sigma x. 11$



ΣΧΗΜΑ 12 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ (ΕΤΕΣ) ΚΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟ

Group I	GLOMERULI				TUBULES		Interstitial	Arterio
	Early	Middle	Advanced	%	Dilated/Cysts	Atrophy	WBCs	ARTERIO
✓ 1	R	+	+	++	20-25%	4+	1-2+	1-2+
	L	+	+	+	15-20%	4+	1+	2+
✓ 3	R	+	+	++	20-25%	4+	1-2+	1-2+
	L	+	++	++	20%	4+	1-2+	1-2+
✓ 5	R	+	+	++	20%	4+	1-2+	1-2+
	L	+	+	++	20-25%	4+	1-2+	1-2+
✓ 9	R	+	+	++	20%	3-4+	1+	1+
	L	+	+	++	20-25%	4+	1-2+	1-2+
✓ 21	R	+	++	+++	20%	4+	1-2+	1-2+
	L	+	+	++	20-25%	3-4+	1-2+	1-2+
✓ 22	R	+	++	+++	20%	4+	1-2+	1-2+
	L	+	+	++	20%	4+	1-2+	1-2+
✓ 24	R	+	+	-	2%	1+	-	-
	L	+	+	-	2%	1+	-	-
Group II				18.1 ± 7%				
✓ 27	R	+	++	+++	20%	2-3+	1+	-
	L	+	+	++	20-25%	2-3+	1+	1+
✓ 28	R	+	+	+	5-10%	3+	-	-
	L	+	+	++	15%	3+	1+	1+
✓ 39	R	+	+	-	2%	1-2+	-	-
	L	+	+/-	-	1-2%	1+	-	-
✓ 41	R	+	+	-	2-4%	2+	-	-
	L	+	+	-	2-5%	2+	-	-
✓ 42	R	+	-	-	1%	tr.	-	-
	L	-	-	-	0	-	-	-
✓ 43	R	+	+	+	2-4%	1+	-	-
	L	-	-	-	0	1+	-	-
✓ 44	R	+	+	+	2%	1-2+	-	-
	L	+	+	+	2%	1-2+	-	-
✓ 45	R	-	+	-	1%	tr.	-	-
	L	+	+	-	2%	1-2+	-	-
Group III				5.4 ± 7%				
✓ 52	R	+	+	-	2%	tr.	-	-
	L	+	-	-	1-2%	tr-1+	-	-
✓ 53	R	-	-	-	0	tr-1+	-	-
	L	+	+	-	1-2%	1+	-	-
✓ 55	R	-	-	-	0	-	-	-

0.6 ± 0

Granululi

Tubule

Interst. WBCs

$\frac{AE}{ari}$

Group I

	E	M	L	%	Dilated/Coats	Atrophy	
√4 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	+	0	10-15%	4+	tr.	3+ (diffuse)
	+	+	+	15-20%	4+	+	+
√6 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	+	+	15-20%	4+	2+	—
	+	+	+	15%	4+	tr.	+
√10 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	+	+	10%	2+	+	—
	+	+	0	10-15%	1-2+	mild	focal 2+
√11 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	+	+	20%	4+	calcif. 4+	+
	+	+	+	10-15%	4+	calcif.	4+
√12 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	+	+	10-15%	4+	+	+
√23 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	+	0	10%	2+	mild	2+ 1+
	+	+	+	10%	4+	+	+

$\frac{137 \pm 34}{126 \pm 34}$

Group II

√26 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	0	0	1-2%	1+	+/-	focal tr.
	0	0	0	—	tr	—	—
√29 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	0	0	1-2%	1+	—	—
	+	+	0	1-2%	1+	—	—
√30 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	0	0	0	—	1+	focal	—
	0	0	0	—	—	—	—
√31 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	+	0	10%	1+	mild	1+
	+	+	0	5%	1+	—	—
√33 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	0	0	1-2%	tr-1+	—	—
	+	0	0	1-2%	1+	—	—
√36 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	0	0	0	—	1+	—	—
	+	0	0	1-2%	1+	—	—
√38 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	+	0	10%	1-2+	mild	1+
	+	+	0	10-15%	2-3+	mild	2+

$\frac{3.3 \pm 4.3}{3.3 \pm 4.3}$

Group IV

√54 $\begin{matrix} R \\ L \end{matrix}$	+	0	0	1-2%	+/-	—	—
	+	0	0	1-2%	1+	—	—

Group I <u>222</u>	Glomeruli				Tubules		Interst. WBCs	Arterio Arterioles
	E	M	L	(%)	Dilated/casts	Atrophy		
√ 17	R	+	+	0	10%	2-3+	1+	—
	L	+	+	0	15%	3+	tr.	+
115	R	+	+	0	15-20%	4+	+	+
	L	+	+	+	20%	4+	tr	+
√ 16	R	+	+	0	10-15%	4+	tr	—
	L	+	+	+	15%	3+	tr	+
117	R	+	+	+	15-20%	2+	1-2+	—
	L	+	+	0	10-15%	2+	+	—
118	R	+	+	0	15-20%	4+	+	+
	L	+	+	+	15-20%	4+	+	+
/ 19	R	+	+	+	20%	3+	tr	—
	L	+	+	+	15-20%	4+	2+	—
					<u>16 ± 3%</u>			

Group II								
√ 32	R	+	+	+	15-20%	4+	tr	+
	L	Abscessed Kidney				0		
√ 34	R	+	+	+	15-20%	3-4+	tr	+
	L	+	+	+	10-15%	3+	tr	+
√ 37	R	+	+	+	10%	tr-1+	tr	+/2
	L	+	0	0	1-2%	tr	—	—
√ 46	R	+	+	+	15%	2-3+	—	—
	L	+	+	+	10-15%	4+	2+	—
√ 48	R	+	+	+	15%	2+	—	—
	L	+	+	0	15-20%	2-3+	1+	—
					<u>15 ± 3%</u>			

Group IV								
√ 49	R	+	0	0	1-2%	1+	tr	—
	L	+	+	0	1-2%	tr.	—	—
√ 50	R	0	0	0	—	—	—	—
	L	+	0	0	1-2%	tr	—	—
√ 51	R	+	0	0	2%	tr-1+	—	—
	L	+	+	0	1-2%	tr	—	—
					<u>1.3 ± 0.7%</u>			