

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΟΤΕΡΩΝ**  
**ΑΝΤΙΠΡΩΤΕΙΝΟΥΡΙΚΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ**  
**ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ**

**Βασιλική Ν. Μαυροειδή**  
**Ιατρός**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ**

**Ε. Παπαβασιλείου** Αναπληρωτής Καθηγητής Ενδοκρινολογίας

**Ε. Γανωτάκης** Καθηγητής Παθολογίας

**Ε. Δαφνής** Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014**

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

### ΠΡΟΛΟΓΟΣ

#### (Α) ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

##### 1. Ανατομία και Ιστολογία

###### 1.1. Αδρή ανατομία και ιστολογία του νεφρού

###### 1.2. Αδρή ιστολογική υφή του σπειράματος

###### 1.2.1. Βασική μεμβράνη του σπειράματος (BM)

###### 1.2.2. Κύτταρα του αγγειακού σπειράματος

###### 1.2.2.a. Μεσαγγειακά κύτταρα

###### 1.2.2.b. Σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα

###### 1.2.2.c. Ποδοκύτταρα

###### 1.3. Σχισμοειδές διάφραγμα ΣΔ (slit diaphragm)

###### 1.3.a. Νεφρίνη

###### 1.3.b. Ποδοσίνη

###### 1.3.c. CD2AP

###### 1.3.d. Tjp-1/ZO-1 (Tight junction protein-1/ zonula occludens- 1)

###### 1.3.e. Πρωτείνες Neph

###### 1.3.f. Καντχερίνη και Κατενίνες (Cadherin and Catenins)

###### 1.3.g. FAT 1

##### 2. Σύστημα Ρενίνης Αγγειοτασίνης (ΣΡΑ)

###### 2.1. Συστηματικό Σύστημα Ρενίνης Αγγειοτασίνης

###### 2.2. Ρύθμιση του συστηματικού ΣΡΑ

###### 2.3. Υποδοχείς Αγγειοτασίνης II – Παλιά και Νέα Δεδομένα

###### 2.4. Διεύρυνση του Κλασσικού Συστήματος Ρενίνης Αγγειοτασίνης

###### 2.5. Τοπικά Συστήματα Ρενίνης Αγγειοτασίνης (ΣΡΑ)

###### 2.5.1. Ενδονεφρική Εντόπιση των Συστατικών του ΣΡΑ

###### 2.6. Ενδοκυτταρικά Συστήματα Ρενίνης Αγγειοτασίνης

##### 3. Διαβητική Νεφροπάθεια

###### 3.1. Κλινική πορεία της διαβητικής νεφροπάθειας

- 3.2. Παθολογοανατομικές βλάβες στη διαβητική νεφροπάθεια
- 3.3. Παθογενετικοί μηχανισμοί της διαβητικής νεφροπάθειας
  - 3.3.1. Αιμοδυναμικές αλλαγές
  - 3.3.2. Μεταβολικές διαταραχές
  - 3.3.3. Διαβητική νεφροπάθεια και σύστημα ρενίνης αγγειοτασίνης
  - 3.3.4. ΣΡΑ και διαμεσολάβηση της νεφρικής βλάβης στο σακχαρώδη διαβήτη
  - 3.3.5. TGF-β
- 3.6. Πρωτεϊνουρία στη διαβητική νεφροπάθεια
- 4. Το μονοπάτι PI3K-Akt-mTOR
  - 4.1. mTOR
  - 4.2. Κινάση των φωσφο-ινοσιτιδίων-3-OH (PI3K)
  - 4.3. Κινάση AKT
  - 4.4. mTORC1
  - 4.5. Ρύθμιση του mTORC1
  - 4.6. Σηματοδοτικοί στόχοι του mTORC1
  - 4.7. mTORC2
  - 4.8. Ρυθμιστές της δράσης του mTORC2
  - 4.9. Σηματοδοτικοί στόχοι του mTORC2
  - 4.10. mTOR σηματοδότηση και καρκίνος
  - 4.11. Akt-mTOR στη Διαβητική Νεφροπάθεια

## (B) ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 1.Εισαγωγή
- 2.Υλικά και Μέθοδοι
  - 2.1. Πειραματόζωα
  - 2.2. Σχεδιασμός της μελέτης
  - 2.3. Απομόνωση σπειραμάτων
  - 2.4. Μελέτη του σπειραματικού υλικού με τη μέθοδο ανοσοστυπώματος κατά Western (Western Blot)

- 2.5. Μελέτες φωτοmikροσκοπίας
- 2.6. Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας
- 2.7. Έμμεσος ανοσοφθορισμός
- 2.8. Ανάλυση συνεντόπισης
- 2.9. Στατιστική ανάλυση
- 3. Αποτελέσματα
  - 3.1. Κλινικές και Βιοχημικές Παράμετροι
    - 3.1.1. Απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα 24h
    - 3.1.2. Μέτρηση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης στο αίμα
    - 3.1.3. Συστολική αρτηριακή πίεση θυσίας (mmHg)
  - 3.2. Εκτίμηση της έκτασης του μεσαγγείου
  - 3.3. Επίδραση της λοσαρτάνης στο πάχος της βασικής μεμβράνης του σπειράματος
  - 3.4. Πρωτεΐνη mTOR και φωσφορυλιωμένη (ενεργοποιημένη) πρωτεΐνη mTOR
    - 3.4.1. Ποσοτική εκτίμηση της πρωτεΐνης mTOR στο σπείραμα
    - 3.4.2. Ποσοτική εκτίμηση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης mTOR στο σπείραμα.
    - 3.4.3. Ποσοτική εκτίμηση της πρωτεΐνης mTOR στα ποδοκύτταρα.
    - 3.4.4. Ποσοτική εκτίμηση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης mTOR στα ποδοκύτταρα.
    - 3.4.5. Πρωτεΐνη ολική AKT (tAKT) και φωσφορυλιωμένη (ενεργοποιημένη) tAKT
    - 3.4.6. Ποσοτική εκτίμηση της ολικής AKT (tAKT) στο σπείραμα.
    - 3.4.7. Ποσοτική εκτίμηση της ολικής AKT (tAKT) στα ποδοκύτταρα.
    - 3.4.8. Ποσοτική εκτίμηση της φωσφορυλιωμένης AKT στη θέση Ser473 (pAKT473) στο σπείραμα.
    - 3.4.9. Ποσοτική εκτίμηση της φωσφορυλιωμένης AKT στη θέση Ser473 (pAKT473) στα ποδοκύτταρα.
    - 3.4.10. Ποσοτική εκτίμηση της φωσφορυλιωμένης AKT στη θέση Thr308 (pAKT308) στο σπείραμα.
    - 3.4.11. Ποσοτική εκτίμηση της φωσφορυλιωμένης AKT στη θέση Thr308 (pAKT308) στα ποδοκύτταρα.
- 4. Συζήτηση

Γ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ΕΛΛΗΝΙΚΗ)

Δ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ΑΓΓΛΙΚΗ)

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να ερευνηθούν οι μηχανισμοί δράσης των νεότερων αντιπρωτεϊνουρικών θεραπειών στη διαβητική νεφροπάθεια τύπου I, σε επίπεδο ενζυμικών λειτουργιών του νεφρικού σπειράματος και ιδίως του ποδοκυττάρου. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Νεφρολογικής Κλινικής το οποίο διευθύνει ο Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας κ. Ευγένιος Δαφνής. Την υψηλή εποπτεία της μελέτης, είχε ο Αναπληρωτής Καθηγητής Ενδοκρινολογίας της Ιατρικής Κρήτης, κ. Ευστάθιος Παπαβασιλείου, ο οποίος με την πείρα και τις γνώσεις του, έδωσε τις ορθές κατευθύνσεις, παρείχε ενθάρρυνση, συνεχή παρότρυνση και υποστήριξη, για να ολοκληρωθεί το επίπονο έργο αυτής της μελέτης. Προς τον Καθηγητή κ. Παπαβασιλείου, για την ανεκτίμητη αυτή βοήθειά του, εκφράζω άπειρες ευχαριστίες.

Τον Καθηγητή Παθολογίας της Ιατρικής Κρήτης, κ. Εμμανουήλ Γανωτάκη, που με τις επισημάνσεις του, υποδείξεις και οδηγίες του βοήθησε για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης, εκ βάθους καρδιάς ευχαριστώ.

Προς τον Επίκουρο Καθηγητή Νεφρολογίας της Ιατρικής Κρήτης, κ. Ευγένιο Δαφνή, ο οποίος έθεσε στη διάθεσή μου το Εργαστήριο Νεφρολογίας που διευθύνει με όλη την υλικοτεχνική υποδομή, είχε την επίβλεψη της όλης πορείας της έρευνας και συνετέλεσε τα μέγιστα για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης, εκφράζω βαθιά ευγνωμοσύνη.

Πολλές ευχαριστίες εκφράζω προς τον Καθηγητή Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κ. Γεώργιο Χαλεπάκη, που ευγενώς έθεσε στη διαθεσή μου το Εργαστήριο που διευθύνει, καθώς και το Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την επιτέλεση ειδικών εργασιών της έρευνάς μου (κρυοτόμος, συνεστιακό μικροσκόπιο, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κτλ).

Τους συνεργάτες του Εργαστηρίου Νεφρολογίας, όπου ο καθένας, στο μέτρο των δυνατοτήτων του, βοήθησε το έργο μου, τους ευχαριστώ. Ιδίως, χάριτας οφείλω στο νεφρολόγο, κ. Κωνσταντίνο Στυλιανού για την πολύτιμη βοήθειά του.

Τέλος, ευχαριστώ το νεφροπαθολογοανατόμο και λέκτορα του Πανεπιστημίου “La Sapienza” της Ρώμης, κ. Κωνσταντίνο Γιαννακάκη, για την παρατήρηση των νεφρικών ιστικών παρασκευασμάτων στο φωτονικό μικροσκόπιο και την αξιολόγηση αυτών.

## (A) Γενικό Μέρος

### 1.ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

#### **1.1.Αδρή ανατομία και ιστολογία του νεφρού[1, 2]**

Ο νεφρός είναι οπισθοπεριτοναϊκό όργανο, εκτείνεται από τον 12<sup>ο</sup> θωρακικό σπόνδυλο έως τον 3<sup>ο</sup> οσφυϊκό. Καλύπτεται από ινώδη κάψα που τον διαχωρίζει από το περινεφρικό λίπος. Από την πύλη του νεφρού διέρχονται ο ουρητήρας, κλάδοι της νεφρικής αρτηρίας και φλέβας, νεύρα και λεμφαγγεία.

Το νεφρικό παρέγχυμα αποτελείται από τη φλοιώδη και τη μυελώδη μοίρα (Εικ 1,2). Η μυελώδης μοίρα απαρτίζεται από σύνολο 8-18 πυραμοειδών περιοχών που ονομάζονται μυελώδεις πυραμίδες. Οι μυελώδεις πυραμίδες χωρίζονται στην έξω και έσω μοίρα (ή αλλιώς θηλή) του μυελού, με την έξω μοίρα να διαχωρίζεται περαιτέρω σε έσω και έξω στοιβάδα. Στον άνθρωπο ο σχετικός όγκος που καταλαμβάνουν ο φλοιός, η έξω και η έσω μοίρα του μυελού είναι αντίστοιχα 70%, 37% και 3%. Η νεφρική θηλή είναι στραμμένη προς τη νεφρική πύελο. Η κορυφή της νεφρικής θηλής –μακροσκοπικά έχει ηθμοειδή μορφή- φέρει 20-70 τρήματα για να ρέει το ούρο. Οι νεφρικές θηλές καταλήγουν στους ελάσσονες κάλυκες οι οποίοι συνενώνονται για να σχηματίσουν τους μείζονες κάλυκες οι οποίοι οδηγούνται στη νεφρική πύελο και εν συνεχεία στον ουρητήρα. Οι βάσεις των μυελικών πυραμίδων, οι οποίες είναι στραμμένες στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού, έχουν κάθετες προσεκβολές στο φλοιό, τις μυελικές ακτίνες που περιέχουν τα ευθέα τμήματα του εγγύς σωληναρίου, του ανιόντος σκέλους της αγκύλης του Henle και του αθροιστικού σωληναρίου.

Ο νεφρικός φλοιός που επεκτείνεται έως 1cm κάτω από την ινώδη κάψα του νεφρού περιβάλλει εξωτερικώς τη μυελώδη ουσία αλλά και εισδύει μεταξύ των μυελωδών πυραμίδων. Οι προσεκβολές αυτές του φλοιού μεταξύ των πυραμίδων της μυελώδους ουσίας ονομάζονται στήλες του Bertin. Ο νεφρικός φλοιός αρχιτεκτονικά οργανώνεται στο λαβύρινθο του φλοιού, τις στήλες του Bertin και τις μυελικές ακτίνες. Ο λαβύρινθος του φλοιού περιέχει το σπείραμα, το εγγύς και άπω εσπειραμένο σωληνάριο, το συνεκτικό σωληνάριο, την αρχική μοίρα του αθροιστικού σωληναρίου, όπως επίσης μεσολοβίδιες αρτηρίες και φλέβες, αρτηριόλια, φλεβίδια, τριχοειδή και λεμφαγγεία. Ο

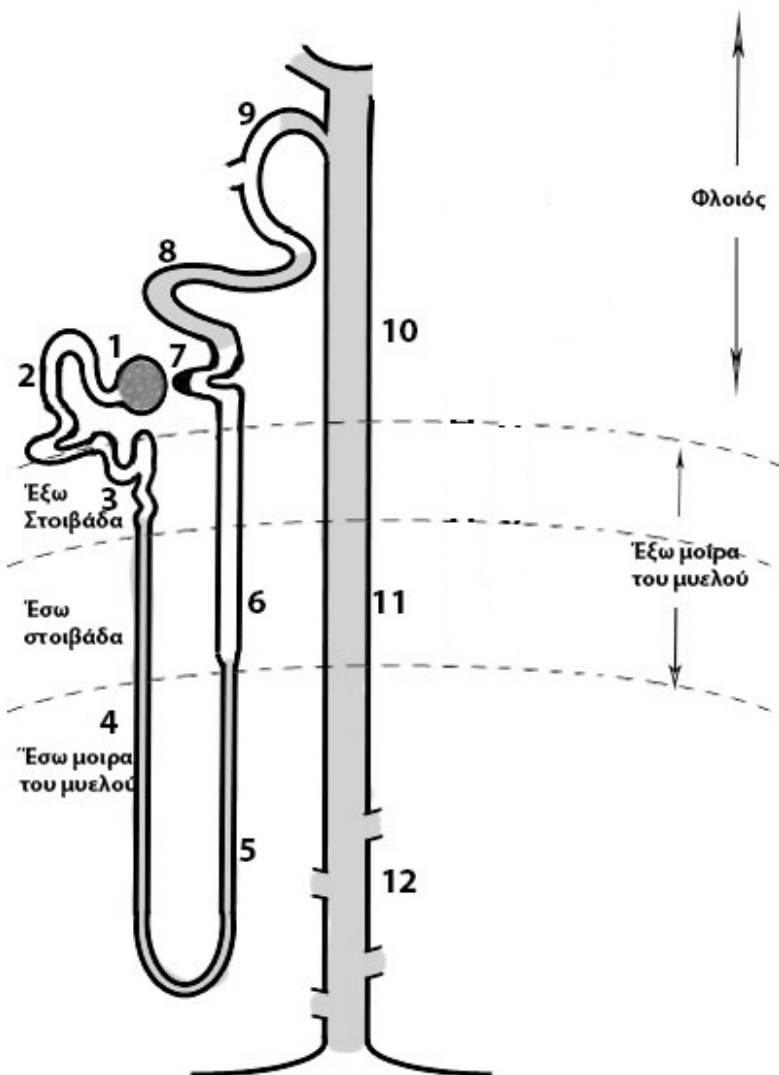


διάμεσος χώρος είναι αραιός και περιλαμβάνει τα περισωληναριακά τριχοειδή και τα διάμεσα κύτταρα.

Στο μυελό, ο ανατομικός διαχωρισμός εξαρτάται από τη διαφορετική σύσταση των σωληναρίων. Στην έξω μοίρα του μυελού η δομή έχει ως εξής:

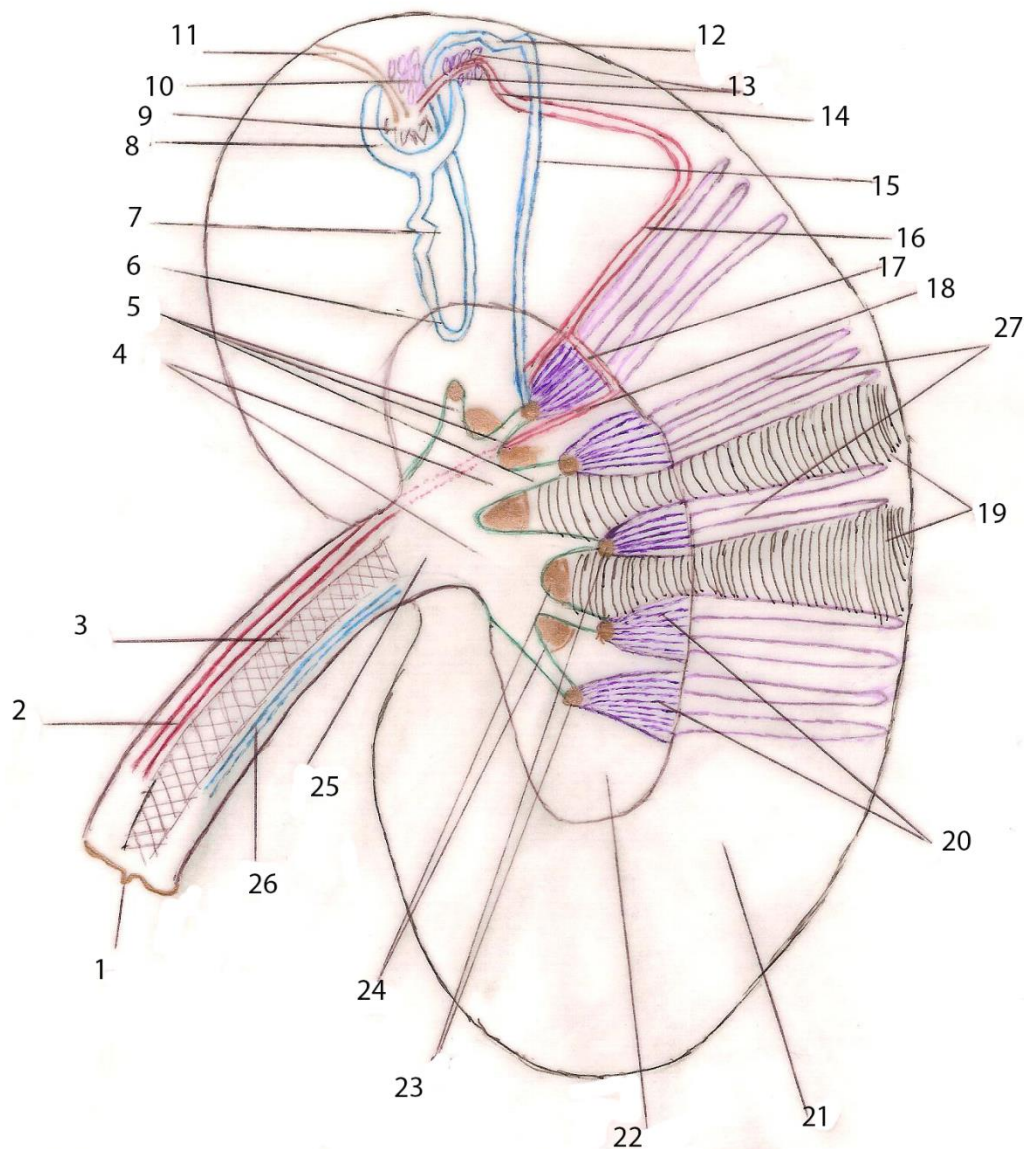
- Η έξω στοιβάδα περιλαμβάνει το ευθύ τμήμα του εγγύς σωληναρίου, το παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle και το αθροιστικό σωληνάριο.
- Η έσω στοιβάδα περιλαμβάνει το λεπτό κατιόν σκέλος και το παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle και το αθροιστικό σωληνάριο.

Στην έσω μοίρα του μυελού περιέχονται το λεπτό κατιόν σκέλος και λεπτό ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle και το αθροιστικό σωληνάριο.



**Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του νεφρονίου και του αθροιστικού πόρου (τροποποιημένο διάγραμμα από αναφορά 1)**

- 1) Αγγειακό σπείραμα και κάψα του Bowman
- 2) Εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο
- 3) Ευθύ τμήμα του εγγύς σωληναρίου
- 4) Κατιόν λεπτό σκέλος της αγκύλης του Henle
- 5) Ανιόν λεπτό σκέλος της αγκύλης του Henle
- 6) Ανιόν παχύ σκέλος της αγκύλης του Henle
- 7) Πυκνή κηλίδα (εντοπίζεται στο τελικό τμήμα του ανιόντος παχέως σκέλους της αγκύλης του Henle)
- 8) Άπω εσπειραμένο σωληνάριο
- 9) Συνεκτικό σωληνάριο
- 10) Αθροιστικό σωληνάριο φλοιού
- 11) Αθροιστικό σωληνάριο έξω μοίρας του μυελού
- 12) Αθροιστικό σωληνάριο έσω μοίρας του μυελού



**Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της υφής του νεφρού**

- 1) Πύλη του νεφρού
- 2) Νεφρική αρτηρία
- 3) Ουρητήρας
- 4) Μείζονες νεφρικοί κάλυκες
- 5) Ελάσσονες νεφρικοί κάλυκες
- 6) Αγκύλη του Henle
- 7) Εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο
- 8) Κάψα του Bowman
- 9) Αγγειακό σπείραμα
- 10) Πυκνή κηλίδα
- 11) Απαγωγό αρτηρίδιο
- 12) Άπω εσπειραμένο σωληνάριο
- 13) Κύτταρα παρασπειραματικής συσκευής
- 14) Προσαγωγό αρτηρίδιο
- 15) Αθροιστικά σωληνάρια
- 16) Μεσολοβίδιος αρτηρία
- 17) Τοξοειδής αρτηρία
- 18) Μεσολόβιος αρτηρία
- 19) Νεφρικοί στύλοι
- 20) Νεφρικές πυραμίδες
- 21) Φλοιός
- 22) Μυελός
- 23) Θηλές
- 24) Λιπώδης ιστός
- 25) Νεφρική πύελος
- 26) Νεφρική φλέβα
- 27) Μυελικές ακτίνες

## **1.2. Αδρή ιστολογική υφή του σπειράματος**

Ανατομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού είναι το νεφρόνιο ή νεφρώνας (Εικ 1,2). Ο αριθμός των νεφρώνιων ποικίλει ανάμεσα στα είδη. Σε κάθε ανθρώπινο νεφρό υπάρχουν περίπου 1.000.000 νεφρώνια ενώ στο νεφρό του αρουραίου περίπου 35.000 νεφρώνια. Το νεφρόνιο αποτελείται από το αγγειακό σπείραμα και την κάψα του Bowman που το περιβάλλει, την παρασπειραματική συσκευή, το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, την αγκύλη του Henle, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο και τελικά καταλήγει στο σύστημα του αθροιστικού σωληναρίου.

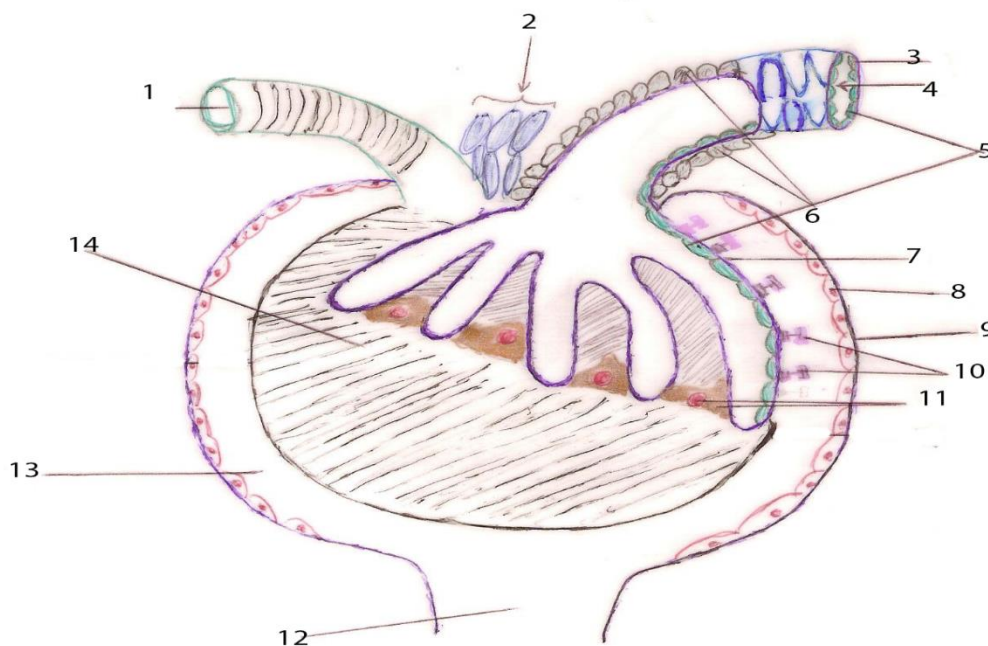
Η διάμετρος του αγγειακού σπειράματος κυμαίνεται ανάμεσα στα είδη, στον άνθρωπο είναι περίπου 200μm ενώ στον αρουραίο είναι 120μm. Το αγγειακό σπείραμα (Εικ 3) αποτελείται από τα τριχοειδή που περιβάλλονται από τη μεσάγγειο ουσία και αυτό ως σύνολο καλύπτεται από τη βασική μεμβράνη του σπειράματος και ένα σύνολο από επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία ονομάζονται ποδοκύτταρα και διατάσσονται σε μία στοιβάδα.

Η αιμάτωση του σπειράματος προέρχεται από το προσαγωγό αρτηρίδιο, το οποίο στο επίπεδο του αγγειακού πόλου, χωρίζεται σε δύο με πέντε κλάδους, οι οποίοι στη συνέχεια δημιουργούν ένα αναστομωτικό δίκτυο τριχοειδών με κατεύθυνση προς τον ουρητηρικό πόλο, που επιστρέφει πάλι προς τον αγγειακό πόλο, σχηματίζοντας το απαγωγό αρτηρίδιο. Τα σπειραματικά τριχοειδή αποτελούν ειδικό τύπο αγγείου, το τοίχωμά του οποίου αποτελείται μόνο από ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία στην εξωτερική επιφάνεια έρχονται σε επαφή με το μεσάγγειο κατά ένα μικρό μέρος, ενώ το μεγαλύτερο μέρος καλύπτεται από τη βασική μεμβράνη του σπειράματος και περαιτέρω από τις προσεκβολές των ποδοκυττάρων.

### **1.2.1. Βασική μεμβράνη του σπειράματος (BM)**

Κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ζωής, η βασική μεμβράνη του σπειράματος δημιουργείται από τη σύντηξη της ενδοθηλιακής και ποδοκυτταρικής βασικής μεμβράνης. Η BM αποτελείται από τρεις στοιβάδες: μια παχιά κεντρική, το πυκνό πέταλο (Lamina Densa), το αραιό έσω πέταλο (Lamina Rara Interna) και το αραιό έξω

πέταλο (Lamina Rara Externa). Κύρια συστατικά της ΒΜ είναι το κολλαγόνο τύπου IV, η λαμινίνη τύπου II (λαμινίνη521), οι πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης που αποτελούνται από έναν πυρήνα πρωτεΐνης και πλευρικές αλυσίδες θειικής ηπαράνης και είναι ισχυρά ανιονικοί πολυσακχαρίτες που ανήκουν στις γλυκοζαμινογλυκάνες (αγκρίνη και περλεκάνη), οι γλυκοπρωτεΐνες εντακτίνη/ νιδογόνο, το κολλαγόνο τύπου V και VI. Η πιο άφθονη πρωτεογλυκάνη θειικής ηπαράνης στη βασική μεμβράνη του σπειράματος είναι η εζρίνη. [3]



**Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του αγγειακού σπειράματος**

- 1) Απαγωγό αρτηρίδιο
- 2) Πυκνή κηλίδα
- 3) Βασική μεμβράνη προσαγωγού αρτηριδίου
- 4) Προσαγωγό αρτηρίδιο
- 5) Ενδοθηλιακά κύτταρα προσαγωγού αρτηριδίου
- 6) Κύτταρα παρασπειραματικής συσκευής
- 7) Βασική μεμβράνη του σπειράματος
- 8) Τοιχωματικό επιθήλιο κάψας Bowman
- 9) Βασική μεμβράνη κάψας Bowman
- 10) Ποδοκύτταρα
- 11) Μεσαγγειακά κύτταρα και μεσάγγειος ουσία
- 12) Εγγύς σωληνάριο
- 13) Ουροφόρος κοιλότητα
- 14) Αγγειακό σπείραμα

### **1.2.2. Κύτταρα του αγγειακού σπειράματος (Εικ 3)**

Στο αγγειακό σπείραμα υπάρχουν τρεις τύποι κυττάρων σε επαφή με τη βασική μεμβράνη:

- Μεσαγγειακά κύτταρα
- Ενδοθηλιακά κύτταρα
- Ποδοκύτταρα

#### **1.2.2.a. Μεσαγγειακά κύτταρα**

Τα μεσαγγειακά κύτταρα μαζί με την εξωκυττάρια ουσία που παράγουν, συνιστούν το μεσάγγειο. Τα μεσαγγειακά κύτταρα σχηματίζουν προσεκβολές οι οποίες καταλήγουν στη βασική μεμβράνη(BM). Στις προσεκβολές αυτές έχει βρεθεί ότι υπάρχει ένα πυκνό δίκτυο μικροϊνιδίων το οποίο λειτουργεί ως μέσο πρόσδεσης των μεσαγγειακών κυττάρων πάνω στη BM. Η μεσάγγειος ουσία αποτελείται από διαφορετικούς τύπους κολλαγόνου (III, IV, V και VI), πρωτεογλυκάνες της θειϊκής ηπαράνης, φιμπρονεκτίνη, λαμινίνη, εντακτίνη και άλλες πρωτεΐνες του ελαστικού ιστού.

#### **1.2.2.b. Σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα**

Τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι μεγάλα, επίπεδα και αποτελούνται από το σώμα και περιφερικά τμήματα, που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη στρογγυλών ή ωσειδών πόρων διαμέτρου εύρους 50-100 nm, οι οποίοι δε γεφυρώνονται από διάφραγμα. Στην ενδοαυλική επιφάνεια τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτονται από πολυανιονικές γλυκοπρωτεΐνες που τους προσδίδουν αρνητικό φορτίο.

#### **1.2.2.c. Ποδοκύτταρα**

Τα ώριμα ποδοκύτταρα αποτελούνται από το σώμα που επιπλέει μέσα στον ουροφόρο χώρο, από το οποίο σώμα, ξεκινούν προς τα τριχοειδή, πρωτογενείς προσεκβολές οι οποίες διακλαδίζονται περαιτέρω προς τις τελικές απολήξεις που ονομάζονται ποδικές προσεκβολές και προσκολλώνται στη βασική μεμβράνη του σπειράματος σε βάθος

εύρους 40-60 nm. Οι ποδικές προσεκβολές γειτονικών ποδοκυττάρων διακλαδίζονται μεταξύ τους αφήνοντας ενδιάμεσως σχισμές με πλάτος 30-40 nm που γεφυρώνονται από μια εξωκυττάρια δομή που ονομάζεται διάφραγμα σχισμής διηθήσεως ή σχισμοειδές διάφραγμα, (ΣΔ) (slit diaphragm). (Εικ 4)

Το σώμα του ποδοκυττάρου περιέχει έναν ευμεγέθη πυρήνα και πληθώρα οργανιδίων σε αντίθεση με τις ποδικές προσεκβολές που περιέχουν πολύ λίγα. Στα ποδοκύτταρα υπάρχει ένα πολύ καλά οργανωμένο σύστημα κυτταροσκελετού ο οποίος προσδίδει τη μορφή τους. Συγκεκριμένα, στο σώμα και στις πρωτογενείς προσεκβολές, μικροσωληνίσκοι και ενδιάμεσα ινίδια (βιμεντίνη και δεσμίνη) κυριαρχούν, ενώ στις ποδικές προσεκβολές ένα σύστημα μικροινιδίων. Τα δεμάτια των μικροινιδίων περιέχουν ακτίνη, συναπτοποδίνη και άλλες πρωτεΐνες. Τα δεμάτια ακτίνης στη βασική επιφάνεια των ποδικών προσεκβολών, αγκυστρώνονται στο κυτταρόπλασμα.

Η προσκόλληση των ποδικών προσεκβολών στη βασική μεμβράνη του σπειράματος γίνεται μέσω, αφ' ενός της  $\alpha\beta 1$  ιντεγκρίνης που αλληλεπιδρά με συστατικά της βασικής μεμβράνης, κολλαγόνο τύπου IV, φιμπρονεκτίνη και λαμινίνη 521 και αφ' ετέρου της δυστρογλυκάνης η οποία αλληλεπιδρά με τη λαμινίνη 521, την αγκρίνη (agrin- πρωτεογλυκάνη θειϊκής ηπαράνης) και την περλεκάνη. Η  $\alpha\beta 1$  είναι η ποδοκυτταρική ιντεγκρίνη που συνδέεται με τη λαμινίνη ενώ οι  $\alpha 1\beta 1$  και  $\alpha 2\beta 1$  συνδέονται με το κολλαγόνο τύπου IV.

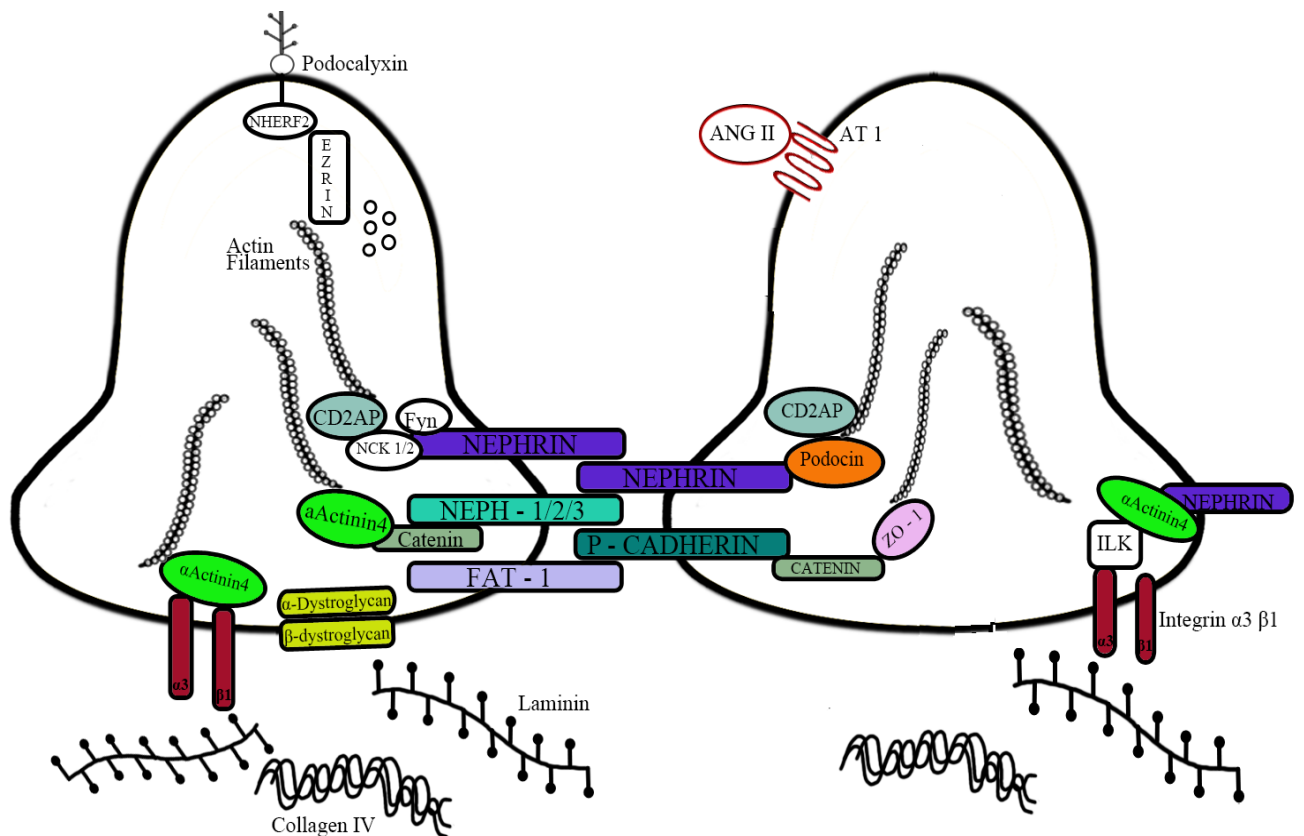
Γενετική απαλειφή οποιασδήποτε ιντεγκρίνης των ποδοκυττάρων και ειδικότερα των  $\alpha 3$  ή  $\beta 1$  έχει βλαπτικά αποτελέσματα για το κύτταρο. Έχει βρεθεί ότι σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων η γενετική απαλειφή του CD151 (tetraspanin family) εξασθενίζει την αλληλεπίδραση της  $\alpha\beta 1$  με τη λαμινίνη της βασικής μεμβράνης και οδηγεί σε σπειραματοπάθεια.[4]

Ποντίκια με γενετική έλλειψη του CD151 παρουσιάζουν απαλειφή των ποδικών προσεκβολών.[5] Αμφότερες, οι ιντεγκρίνες και οι δυστρογλυκάνες αντιδρούν με μόρια του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων μέσω πρωτεϊνών, όπως η  $\alpha$ -ακτινίνη 4 και η paxillin και κατά αυτόν τρόπο διευκολύνεται η μετάδοση σηματοδοτικών ερεθισμάτων.

Οι δυστρογλυκάνες είναι συνδετικός κρίκος ανάμεσα στη βασική μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό των κυττάρων. Αποτελούνται από 2 υποομάδες: την εξωκυττάρια α- που προσδένει λαμινίνη και άλλα στοιχεία της βασικής μεμβράνης και τη διαμεμβρανική β-. Τα δεδομένα στη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο των δυστρογλυκανών στη λειτουργία των ποδοκυττάρων είναι διαφορετικά. Σε ποντίκια στα οποία είχε γίνει γενετική απαλειφή των δυστρογλυκανών στα ποδοκύτταρα, δεν παρουσιάστηκαν μορφολογικές διαταραχές ή λειτουργικές διαταραχές στο νεφρό.[6] Αντίθετα στη νεφροπάθεια από αδριαμυκίνη στους αρουραίους, η έκφραση της δυστρογλυκάνης ήταν μειωμένη και η κατανομή της διαφορετική από αυτή των υγιών μαρτύρων [7], όπως επίσης και σε βιοψίες ασθενών με νόσο των ελαχίστων αλλοιώσεων, βρέθηκε ότι μειώνεται η χρώση για δυστρογλυκάνες. [8]

Προσφάτως έχουν προκύψει δεδομένα σχετικά με υποδοχείς στην επιφάνεια των ποδοκυττάρων και για σηματοδοτικούς μηχανισμούς που ξεκινούν από τα ποδοκύτταρα. Μεταξύ αυτών είναι η ανακάλυψη της ύπαρξης του υποδοχέα AT1 της αγγειοτασίνης II στην επιφάνεια των ποδοκυττάρων.

Το σχισμοειδές διάφραγμα σχηματίζεται από ένα σύμπλεγμα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που συνδέονται στην ακτίνη του κυτταροσκελετού με τη διαμεσολάβηση άλλων πρωτεϊνών. Αυτή η δομή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο φραγμό μεγέθους κατά τη διήθηση του αίματος. Επιπλέον, η κορυφαία επιφάνεια των ποδοκυττάρων και οι προσεκβολές τους καλύπτονται από αρνητικά φορτισμένες πρωτεογλυκάνες όπως είναι η ποδοκαλυξίνη και η ποδοπλανίνη, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της μορφής του ποδοκυττάρου.[9] Η σιαλοποίηση των γλυκοπρωτεϊνών (συμπεριλαμβανομένης και της ποδοκαλυξίνης) έχει επιπλέον επίδραση στο αρνητικό φορτίο, και κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένας δεύτερος φραγμός στη διήθηση των ουσιών, ο φραγμός φορτίου. Στο φραγμό φορτίου συμμετέχουν επίσης η βασική μεμβράνη και τα ενδοθηλιακά κύτταρα.



**Εικόνα 4 Σχηματική απεικόνιση του σχισμοειδούς διαφράγματος (τροποποιημένο διάγραμμα από αναφορά 1)**

Δύο γειτονικές ποδικές προσεκβολές γεφυρώνονται από το σχισμοειδές διάφραγμα. Η επιφάνεια των ποδοκυττάρων είναι αρνητικά φορτισμένη λόγω του ότι καλύπτεται από τις αρνητικά φορτισμένες σιαλοπρωτεΐνες. Η βασική μεμβράνη του σπειράματος αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη και πρωτεογλυκάνες της θειϊκής ηπαράνης. Το σχισμοειδές διάφραγμα αποτελεί μια πολυπρωτεϊνική πορώδη μεμβράνη που σχηματίζεται από τη νεφρίνη, την ποδοσίνη και τις πρωτεΐνες neph1/2, P-cadherin και FAT1. Η ακτίνη του κυτταροσκελετού των ποδικών προσεκβολών συνδέεται και με το σχισμοειδές διάφραγμα και τη βασική μεμβράνη του σπειράματος. Απεικονίζεται ο υποδοχέας AT1 της αγγειοτασίνης II στην επιφάνεια του ποδοκυττάρου.

### 1.3. Σχισμοειδές διάφραγμα ΣΔ (slit diaphragm) (Εικ 4)

Οι γειτονικές ποδικές προσεκβολές γεφυρώνονται από το σχισμοειδές διάφραγμα. Πρόσφατα δεδομένα έχουν οδηγήσει στην αποκάλυψη των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που είναι συστατικά της δομής του, συμπεριλαμβανομένων της νεφρίνης, Nephrin, p-cadherin και FAT. Άλλες πρωτεΐνες όπως η ZO1, η ποδοσίνη, η CD2AP και οι κατενίνες διαμεσολαβούν τη σύνδεση με την ακτίνη του κυτταροσκελετού του ποδοκυττάρου.



### **1.3.a. Νεφρίνη**

Το γονίδιο NPHS1, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19q13, κωδικοποιεί τη νεφρίνη, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 180 kDa που ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Η νεφρίνη διαθέτει ένα μικρό ενδοκυττάριο σκέλος και ένα εξωκυττάριο που περιλαμβάνει μία εγγύς - προς την κυτταρική μεμβράνη- περιοχή που μοιάζει με φιμπρονεκτίνη τύπου III, ακολουθούμενη από 8 περιοχές που μοιάζουν με IgG. Οι περιοχές IgG της νεφρίνης είναι χαρακτηριστικές για πρωτεΐνες που διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων ή αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας. Στο νεφρό, η νεφρίνη εντοπίζεται αποκλειστικά στα ποδοκύτταρα, με μόρια νεφρίνης από γειτονικές ποδικές προσεκβολές να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στο μέσο της σχισμής κατά τη συγκρότηση του σχισμοειδούς διαφράγματος. Έχει βρεθεί ότι οι άπω IgG1 και IgG2 περιοχές εντοπίζονται στην κεντρική περιοχή του σχισμοειδούς διαφράγματος.

Στον άνθρωπο, η νεφρίνη έχει εντοπισθεί και στον παγκρεατικό ιστό. Το γεγονός ότι ασθενείς με μεταλλάξεις του γονιδίου της νεφρίνης δεν παρουσιάζουν διαταραχή στην παγκρεατική τους λειτουργία, πιθανώς σημαίνει ότι δεν υπάρχει μείζων εξωνεφρικός ρόλος για τη νεφρίνη. [10]

### **Νεφρίνη και σπειραματικές παθήσεις [10]**

Μεταλλάξεις στο γονίδιο της νεφρίνης προκαλούν το Φιλανδικού τύπου συγγενές νεφρωσικό σύνδρομο (Congenital nephrotic syndrome of the finnish type - CNF) που συναντάται σε 1/8200 γεννήσεις στη Φιλανδία. Στο φιλανδικό πληθυσμό, δύο είναι οι συχνότερες μεταλλάξεις, Fin- major (απαλειφή 2bp στο εξόνιο 2) και Fin-minor (nonsense μετάλλαξη στο εξόνιο 26). Οι ασθενείς με κάποια από αυτές τις μεταλλάξεις παρουσιάζουν σοβαρό νεφρωσικό σύνδρομο από τη νεογνική ηλικία. Αντίθετα, κάποιες missense μεταλλάξεις του γονιδίου της νεφρίνης προκαλούν ηπιότερες μορφές CNF. Στις επίκτητες πρωτεϊνουρικές παθήσεις, ο ρόλος της νεφρίνης δεν είναι διασαφηνισμένος. Τα δεδομένα για την έκφρασή της είναι αντιφατικά. Συγκεκριμένα σε κάποιες παθήσεις έχει βρεθεί να είναι μειωμένη ή να έχει ανακατανεμηθεί στο

ποδοκύτταρο,[11, 12] ενώ κάποιες άλλες μελέτες δεν παρουσιάζουν αλλαγές στην έκφρασή της.[13, 14]

### **Νεφρίνη και σηματοδότηση**

Η νεφρίνη, εκτός από δομικό συστατικό του σχισμοειδούς διαφράγματος, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, έχει βρεθεί να διαδραματίζει ρόλο στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση στο ποδοκύτταρο. Η φωσφορυλίωση της νεφρίνης, σε θέσεις τυροσίνης, έχει ως συνέπεια την προσέλκυση της πρωτεΐνης Nck η οποία αφ' ενός αλληλεπιδρά με τη νεφρίνη μέσω της περιοχής SH2 και αφ' ετέρου αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω της περιοχής SH3 και προκαλεί πολυμερισμό.

Επίσης, έχει παρατηρηθεί σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων ότι η αναστολή της κινάσης mTOR έχει ως συνέπεια τη μείωση της νεφρίνης και της πρωτεΐνης Nck.[15] Έχει παρατηρηθεί ακόμα, ότι η φωσφορυλιωμένη, από την κινάση Fyn, νεφρίνη αλληλεπιδρά με τη ρυθμιστική υπομονάδα της κινάσης των φωσφοϊνοσιτιδίων (PI3K) και οδηγεί στην αναδιοργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων. Είναι πιθανόν επομένως, μια διαταραχή στην αλληλεπίδραση της νεφρίνης και της PI3K να οδηγεί σε δυσλειτουργία του ποδοκυττάρου.[16]

### **1.3.b. Ποδοσίνη**

Η ποδοσίνη είναι μια πρωτεΐνη με MW 42Kda, ανήκει στην οικογένεια των στοματινών και είναι σε σχήμα φουρκέτας (hairpin-like), με το NH<sub>2</sub>- και το COOH- τελικό άκρο της να βρίσκονται ενδοκυττάρια. Η ποδοσίνη αλληλεπιδρά μέσω του καρβοξυ- τελικού άκρου της με τη νεφρίνη και τη CD2AP, σχηματίζοντας λιπιδικές σχεδίες (lipid rafts). Ενώ η νεφρίνη συνεισφέρει άμεσα στη διάρθρωση του σχισμοειδούς διαφράγματος, η ποδοσίνη και η CD2AP διαμεσολαβούν τη σύνδεση της νεφρίνης με την ακτίνη του κυτταροσκελετού. Μεταλλάξεις του γονιδίου NPHS2 που κωδικοποιεί την ποδοσίνη έχουν βρεθεί σε κάποιες μορφές του ανθεκτικού σε στεροειδή νεφρωσικού συνδρόμου.[17]

Σε επίκτητες νεφρικές παθήσεις όπως είναι η διαβητική νεφροπάθεια τα αποτελέσματα για την έκφραση της ποδοσίνης είναι αντικρουόμενα. Από τη μια πλευρά, μελέτες σε πειραματόζωα υποστηρίζουν μείωση της ποδοσίνης, ενώ υπάρχουν και μελέτες σε βιοψίες ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια όπου διαπιστώθηκε ότι η ποδοσίνη δεν αλλάζει.[18, 19]

### **1.3.c. CD2AP**

Η CD2AP (CD2 adapter protein) είναι μια πρωτεΐνη 80-kilodalton και είχε βρεθεί αρχικά να αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή της CD2 στη μεμβράνη των T λεμφοκυττάρων και των κυττάρων φυσικών φονέων (natural killer), διευκολύνοντας έτσι την προσκόλληση των T λεμφοκυττάρων στα κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνα. Η CD2AP έχει βρεθεί και σε άλλους ιστούς με την πλειοψηφία των κυττάρων που εξέφραζαν CD2AP να είναι ενδοθηλιακά ή επιθηλιακά.[20] Στο νεφρό η CD2AP εντοπίζεται στα ποδοκύτταρα και αλληλεπιδρά με COOH- τελικό άκρο της με το κυτταροπλασματικό τμήμα της νεφρίνης και όπως ήδη αναφέρθηκε διαμεσολαβεί τη σύνδεση της με την ακτίνη του κυτταροσκελετού.[21]

Επίσης στο νεφρό, η CD2AP δεν περιορίζεται μόνο στα ποδοκύτταρα, αλλά εντοπίζεται στο αθροιστικό, στο εγγύς και άπω σωληνάριο.[22]

Σε ποντίκια knock out για τη CD2AP διαπιστώθηκε ανοσοκαταστολή και νεφρική ανεπάρκεια. Βέβαια, σε επίκτητες νεφρικές παθήσεις δεν έχει παρατηρηθεί αλλαγή στην έκφραση της CD2AP σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Ενδεικτικά αναφέρονται η IgA νεφροπάθεια αλλά και ο σακχαρώδης διαβήτης.[18, 19, 23]

### **1.3.d. Tjp-1/ZO-1 (Tight junction protein-1/ zonula occludens- 1)**

Η ZO-1 (πρωτεΐνη-1 των στεγανών συνδέσεων) είναι μια πρωτεΐνη 225-Kd η οποία εντοπίζεται στις θέσεις που εισέρχεται το σχισμοειδές διάφραγμα στην πλαγία επιφάνεια του ποδοκυττάρου. Επίσης εντοπίζεται σε όλο το μήκος του νεφρωνίου με πιο έντονη εντόπιση στο ποδοκύτταρο. Η ZO-1, αρχικά στο αναπτυσσόμενο ποδοκύτταρο, βρίσκεται στα συμπλέγματα συνδέσεων της κορυφαίας επιφάνειας (tight

and adherens junctions) και διατηρείται καθώς αυτά μεταναστεύουν στη πλάγια επιφάνεια του ποδοκυττάρου και σχηματίζουν το σχισμοειδές διάφραγμα. Η παρουσία της ZO-1, μιας πρωτεΐνης στεγανών συνδέσεων (tight junction/ zonula occludens), στο σχισμοειδές διάφραγμα υποδηλώνει αφ' ενός ότι μόνο η παρουσία της δεν αρκεί για τη δημιουργία στεγανών συνδέσεων και αφ' ετέρου ότι διαδραματίζει και κάποιον άλλο ρόλο εκτός της δημιουργίας αυτού του τύπου των συνδέσεων.[24]

Σε μελέτες σε πειραματόζωα, διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση αντισώματος έναντι της νεφρίνης είχε ως επιπλέον συνέπεια τη μείωση της ZO-1.[25, 26] Η ZO-1 αλληλεπιδρά με το κυτταροπλασματικό τμήμα της neph1 και την ακτίνη του κυτταροσκελετού.[2]

### **1.3.e. Πρωτεΐνες Neph**

Οι πρωτεΐνες Neph (1, 2, 3) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και έχουν ομολογία με τη νεφρίνη. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν ένα κυτταροπλασματικό τμήμα, του οποίου η δομή έχει συντηρηθεί δια μέσου της εξέλιξης των ειδών, μέσω του οποίου οι Neph αλληλεπιδρούν με την ποδοσίνη.[27] Το κυτταροπλασματικό τμήμα των Neph και συγκεκριμένα τα αμινοξέα του καρβόξυ- τελικού άκρου, αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη ZO-1 η οποία εν συνεχεία συνδέεται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού του ποδοκυττάρου. Το εξωκυττάριο τμήμα της Neph 1 προσδένεται με τη νεφρίνη στο σχισμοειδές διάφραγμα.[28]

### **1.3.f. Καντχερίνη και Κατενίνες (Cadherin and Catenins)**

Στη δομή του σχισμοειδούς διαφράγματος συμμετέχουν η P-cadherin και οι κατενίνες α, β, γ. Η P-cadherin είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη της οποίας το εξωκυττάριο τμήμα συνεισφέρει στο σχηματισμό του σχισμοειδούς διαφράγματος ενώ το κυτταροπλασματικό της τμήμα συνδέεται με τη β ή γ κατενίνη.[29] Το τελευταίο αυτό σύμπλοκο προσδένεται στην ακτίνη του κυτταροσκελετού, μέσω αλληλεπίδρασης του με την α κατενίνη η οποία στη συνέχεια αντιδρά είτε με την α-ακτινίνη 4, είτε με την ZO-1. Η ZO-1 και η ακτινίνη 4 αλληλεπιδρούν απευθείας με την ακτίνη.

### **1.3.g. FAT 1**

Η πρωτεΐνη FAT 1 ανήκει στην υπερικογένεια των cadherins. Το εξωκυττάριο τμήμα της, το οποίο περιλαμβάνει 34 επαναλήψεις μιας αλληλουχίας αμινοξέων ειδικής για τις cadherins, έχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του σχισμοειδούς διαφράγματος και είναι απαραίτητη για τη διαμόρφωση των προσεκβολών των ποδοκυττάρων.[30]

## **2.ΣΥΣΤΗΜΑ ΡΕΝΙΝΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΑΣΙΝΗΣ (ΣΡΑ)**

Το σύστημα ρενίνης αγγειοτασίνης (ΣΡΑ), εξαιρετικά συντηρημένο κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, είναι βασικός ρυθμιστής της ομοιόστασης νατρίου και εξωκυττάρου υγρού και κατά συνέπεια της αρτηριακής πίεσης. Πρόκειται για ένα σύστημα διαδοχικών αντιδράσεων, ενζύμων και υποστρωμάτων, οι οποίες στην επιστήμη της Βιοχημείας χαρακτηρίζονται ως «καταρράκτες» καθώς το προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης είναι υπόστρωμα της επόμενης. Η ρενίνη, η οποία συντίθεται στα κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής, καταλύει την αντίδραση μετατροπής του αγγειοτασινογόνου, μιας πρωτεΐνης ηπατικής προελεύσεως, σε αγγειοτασίνη Ι. Εν συνεχεία, η αγγειοτασίνη Ι μετατρέπεται, στους πνεύμονες, μέσω της δράσης του μετατρεπτικού ενζύμου σε αγγειοτασίνη ΙΙ. Εκτός από το προαναφερθέν ΣΡΑ της συστηματικής κυκλοφορίας (συστηματικό ΣΡΑ), πρόσφατα δεδομένα καταδεικνύουν την ύπαρξη τοπικών συστημάτων ρενίνης αγγειοτασίνης σε διάφορα όργανα, μεταξύ αυτών και του νεφρού, τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία των οργάνων ειδικά σε παθολογικές καταστάσεις.

### **2.1.Συστηματικό Σύστημα Ρενίνης Αγγειοτασίνης [31]**

**ΡΕΝΙΝΗ.** Το κλασσικό σύστημα ρενίνης αγγειοτασίνης ξεκινά με τη σύνθεση του ενζύμου ρενίνη στα κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής (Εικ 5) του προσαγωγού αρτηριολίου. Η ρενίνη κωδικοποιείται από ένα γονίδιο του οποίου το mRNA μεταφράζεται σε μια πρωτεΐνη 401 αμινοξέων την προ-προρενίνη (preprorenin). Στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων της παρασπειραματικής συσκευής γίνεται επεξεργασία ενζυματικά. Η ρενίνη προκύπτει από την ενζυματική αποκοπή ενός πεπτιδίου 43 αμινοξέων από το N- τελικό άκρο της προρενίνης.

**ΑΓΓΕΙΟΤΑΣΙΝΟΓΟΝΟ.** Το αγγειοτασινογόνο αποτελεί το υπόστρωμα της ρενίνης και πηγή προέλευσης όλων των πεπτιδίων αγγειοτασίνης. Παράγεται στο ήπαρ και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Η ενεργός ρενίνη αποκόπτει 10

αμινοξέα από το N- τελικό άκρο του αγγειοτασινογόνου και προκύπτει η αγγειοτασίνη I. Στους ανθρώπους, η συγκέντρωση του αγγειοτασινογόνου στο πλάσμα πλησιάζει την σταθερά Michaelis- Menten (Km) της ρενίνης με αποτέλεσμα οποιαδήποτε αλλαγή στα επίπεδα του αγγειοτασινογόνου στο πλάσμα να επηρεάζει την παραγωγή της αγγειοτασίνης I.[32]

**ΜΕΤΑΤΡΕΠΤΙΚΟ ΕΝΖΥΜΟ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΑΣΙΝΗΣ.** Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης (ΜΕΑ) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 180 kDa και δύο ενεργά καρβοξυ-τελικά άκρα και απομακρύνει 2 αμινοξέα από το C- τελικό άκρο της αδρανούς αγγειοτασίνης I, μετατρέποντάς την στη βιολογικά δραστική αγγειοτασίνη II.[33] Το ΜΕΑ εκφράζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων σε ολόκληρο το ανθρώπινο σώμα και ιδιαιτέρως στον πνεύμονα, στο έντερο, τα χοριοειδή πλέγματα, τον πλακούντα και την ψηκτροειδή παρυφή των μεμβρανών του νεφρού. Εκτός από την πρωτεολυτική μετατροπή της αγγειοτασίνης I σε αγγειοτασίνη II, το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης μεταβολίζει τη βραδυκινίνη, μια ισχυρά αγγειοδιασταλτική και νατριουρητική ουσία στον ανενεργό της μεταβολίτη ΒΚ(1-7).

**ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗ.** Η αλδοστερόνη είναι μια στεροειδής ορμόνη η οποία συντίθεται στη σπειροειδή ζώνη των επινεφριδίων. Οι δύο κύριοι ρυθμιστές της σύνθεσης και έκκρισης της αλδοστερόνης είναι η αγγειοτασίνη II και τα ιόντα καλίου. Η δράση της αγγειοτασίνης II αρχίζει με τη σύνδεσή της με ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των στεροειδοπαραγωγών κυττάρων της σπειροειδούς στιβάδας των επινεφριδίων. Η αλδοστερόνη επηρεάζει τη διαχείριση του νατρίου στον άπω νεφρώνα μέσω πρόσδεσης της στον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, ο οποίος δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στον ιστό- στόχο. Η πρόσδεση της αλδοστερόνης στον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών στο αθροιστικό σωληνάριο, επάγει τη μεταγραφή της α- υπομονάδας και την πολυμερική σύνδεση των α-, β- και γ- υπομονάδων του διαύλου νατρίου των επιθηλιακών κυττάρων του αθροιστικού σωληναρίου και τελικά τη μετατόπιση αυτού του συμπλέγματος προς την πλευρά του

αυλού του σωληναρίου.[34] Ανεξάρτητα από το διάλυο νατρίου, η αλδοστερόνη ρυθμίζει η μεταφορά του νατρίου στον άπω νεφρώνα, επάγοντας την έκφραση και τη δραστηριότητα του ευαίσθητου στις θειαζίδες συμμεταφορέα νατρίου- χλωρίου.[35]

**AT1 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.** Οι κλασσικές δράσεις της αγγειοτασίνης II διαμεσολαβούνται δια των AT1 υποδοχέων και προκαλούν αγγειοσύσπαση, παραγωγή αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια και τη διαμεσολαβούμενη από την αλδοστερόνη κατακράτηση νατρίου στο αθροιστικό σωληνάριο.[36]

## **2.2.Ρύθμιση του συστηματικού ΣΡΑ**

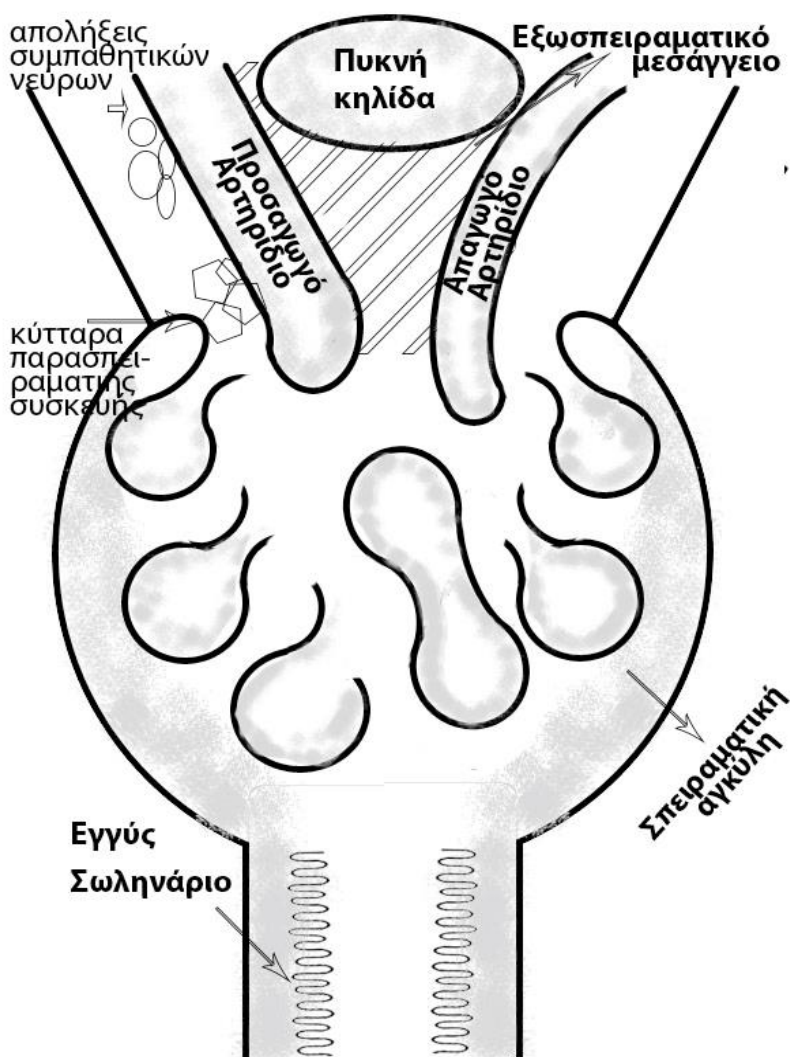
Στη σειρά αντιδράσεων παραγωγής αγγειοτασίνης II, η αντίδραση της ρενίνης με το αγγειοτασινογόνο είναι εκείνη, της οποίας η ταχύτητα καθορίζει το όριο της ταχύτητας του συνόλου των εν σειρά, διαδοχικών αντιδράσεων (rate- limiting step) και επομένως την ταχύτητα παραγωγής αγγειοτασίνης II. Τούτο συμβαίνει διότι η συγκέντρωση του αγγειοτασινογόνου είναι πολύ κοντά στην  $K_m$  του ενζύμου και οποιαδήποτε μεταβολή επιταχύνει ή επιβραδύνει αυτήν την αντίδραση δραματικά. Υπό συνθήκες επιτάχυνσης αυξάνεται σημαντικά η παραγωγή αγγειοτασίνης I που είναι το υπόστρωμα για την επόμενη αντίδραση και άρα σύμφωνα με την αρχή του Le Chatellier αυξάνεται αντίστοιχα και η ταχύτητα μετατροπής αγγειοτασίνης I σε αγγειοτασίνη II, από το μετετρεπτικό ένζυμο. Τα αντίθετα συμβαίνουν αν ελαττωθεί ο ρυθμός παραγωγής της αγγειοτασίνης I λόγω ελάττωσης της συγκέντρωσης του αγγειοτασινογόνου. Η ρενίνη παράγεται και αποθηκεύεται στα κοκκία των κυττάρων της παρασπειραματικής συσκευής και η έκκριση της συμβαίνει σε απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα. Η απελευθέρωση της ρενίνης από τα κοκκία, ρυθμίζεται θετικά από το δεύτερο μήνυμα cAMP, ενώ σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τις εξωκυττάρειες και ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις Ca.[37, 38] Υπάρχουν οι εξής μηχανισμοί[39] με τους οποίους γίνεται η ρύθμιση της απελευθέρωσης ρενίνης:

1) Οι υποδοχείς πίεσης στο προσαγωγό αρτηρίδιο. Η παραγωγή της ρενίνης αναστέλλεται σε υψηλή αρτηριακή πίεση. Αντιθέτως, όταν ανιχνευθεί χαμηλή πίεση



αυξάνεται η παραγωγή και η απέκκριση της ρενίνης, οδηγώντας σε επίταση της δραστηριότητας ολόκληρου του ορμονικού καταρράκτη.

- 2) Διακυμάνσεις στη μεταφορά χλωριούχου νατρίου στα κύτταρα της πυκνής κηλίδας
- 3)  $\beta$  - αδρενεργικοί υποδοχείς
- 4) Τα επίπεδα αγγειοτασίνης II επηρεάζουν την παραγωγή και την έκκριση ρενίνης μέσω αρνητικού ανατροφοδοτικού μηχανισμού.
- 5) Τα επίπεδα καλίου, το νατριουρητικό πεπτίδιο των καρδιακών κόλπων



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της παρασπειραματικής συσκευής

### 2.3. Υποδοχείς Αγγειοτασίνης II – Παλιά και Νέα Δεδομένα

Οι βιολογικές δράσεις της αγγειοτασίνης II διαμεσολαβούνται από τους υποδοχείς της αγγειοτασίνης οι οποίοι χωρίζονται σε 2 φαρμακολογικές τάξεις υποδοχέων με επτά

διαμεμβρανικές περιοχές: τύπου 1 (AT1) και τύπου 2 (AT2), βάσει διαφορετικής συγγένειας για διαφόρους μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές.[40] Οι κλασσικές δράσεις του συστήματος ρενίνης αγγειοτασίνης διαμεσολαβούνται από τους υποδοχείς AT1. Οι υποδοχείς AT1 από διάφορα είδη έχουν κλωνοποιηθεί και έχουν βρεθεί δύο υπότυποι AT1α και AT1β στους επίμυες και μύες.[41] Οι AT1α υποδοχείς υπερισχύουν σε πολλά όργανα έναντι των AT1β, εκτός από τα επινεφρίδια και περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος όπου φαίνεται να υπερισχύει η έκφραση των AT1β.[42]

Οι AT1 και AT2 εκφράζονται στο νεφρό και μάλιστα ο αριθμός τους ρυθμίζεται με τέτοιο τρόπο ούτως ώστε κατά την ωρίμανση του νεφρού οι AT1 αυξάνονται.

Οι υποδοχείς AT1 συνδέονται με G πρωτείνες, οι οποίες επάγουν διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης, όπως η ενεργοποίηση των φωσφολιπασών. Επίσης, προκαλούν απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου με μηχανισμούς που εμπλέκουν την οξειδάση NADPH. Επιπλέον, έχει βρεθεί αλληλεπίδραση της αγγειοτασίνης και του EGFR σε χρόνια νεφρική βλάβη μέσω του TGF- $\alpha$ .[43] Οι περισσότερες παθοφυσιολογικές λειτουργίες της αγγειοτασίνης II διαμεσολαβούνται από τους AT1 υποδοχείς και συμπεριλαμβάνουν αγγειοσύσπαση, έκκριση αλδοστερόνης, δράσεις στο σωληνάριο του νεφρού, προφλεγμονώδεις και προϊνωτικές δράσεις, όπως επίσης και δράσης της ίδιας της ορμόνης ως αυξητικού παράγοντα.[36]

Η αγγειοτασίνη II είναι μια κυττοκίνη που εμπλέκεται σε διαδικασίες νεφρικής βλάβης και ίνωσης σε πολλές χρόνιες νεφρικές παθήσεις ανεξαρτήτως αιτιολογίας.[44]

Η αγγειοτασίνη II, δρώντας στους AT1, επάγει μια σειρά διαμεσολαβητών όπως ο TGF $\beta$ , CTGF, η ενδοθηλίνη-1, ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (plasminogen activator inhibitor-1), η μεταλλοπρωτεϊνάση 2, οι οποίοι οδηγούν σε νεφρική βλάβη.

Η δράση των AT2 υποδοχέων σε μηχανισμούς νεφρικής βλάβης και ίνωσης δεν έχει διευκρινισθεί. Εμπλέκονται σε αναστολή της υπερτροφίας των κυττάρων και της συγκέντρωσης φλεγμονωδών κυττάρων, στο νεφρό. Σε μοντέλα πειραματοζώων έχει βρεθεί ότι η γενετική απαλειφή του AT2 υποδοχέα οδηγεί σε αύξηση της νεφρικής ίνωσης. Επίσης, σε ένα μοντέλο όπου χρησιμοποιήθηκαν αρουραίοι ευάλωτοι σε

αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, διαπιστώθηκε ότι η χρήση του ειδικού αγωνιστή για τον AT2 υποδοχέα πρόλαβε την διήθηση του νεφρικού παρεγχύματος από φλεγμονώδη κύτταρα, τη συσσώρευση κολλαγόνου και την έκφραση της βιμεντίνης.[45] Σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω, νέα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο AT2 υποδοχέας διαμεσολαβεί προφλεγμονώδεις δράσεις και προάγει την ίνωση και την υπερτροφία των κυττάρων.[46] Επίσης, σε ποδοκύτταρα καλλιεργημένα σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης, η αγγειοτασίνη II μέσω του AT2 υποδοχέα προκάλεσε αύξηση του mRNA και της πρωτεΐνης του υποδοχέα των προϊόντων γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end products).[47]

Σε ό,τι αφορά τη δράση του AT2 υποδοχέα στα αγγεία, έχει διαπιστωθεί ότι προκαλεί αγγειοδιαστολή μέσω του μονοξειδίου του αζώτου και μονοπατιών εξαρτώμενων και μη από τη βραδυκίνη. Στο νεφρό, ο AT2 διεγείρει τα μονοπάτια του μονοξειδίου του αζώτου και της βραδυκίνης, προκαλώντας αγγειοδιαστολή και ως εκ τούτου πιθανώς να προστατεύει τον νεφρό από την ισχαιμική βλάβη.[48]

Εκτός από το νεφρό, σε άλλους ιστούς, πειράματα με τη χρήση του, ειδικού για τον υποδοχέα AT2, αγωνιστή C21 είχαν ως εξής: σε υπερτασικούς αρουραίους (Spontaneously hypertensive rats) προκλήθηκε αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο με έγχυση ενδοθηλίνης 1 στη μέση εγκεφαλική αρτηρία και η χορήγηση του αγωνιστή για τον AT2 υποδοχέα είχε νευροπροστατευτική δράση, η οποία ήταν ανεξάρτητη από την αρτηριακή πίεση.[49]

#### **2.4.Διεύρυνση του Κλασσικού Συστήματος Ρενίνης Αγγειοτασίνης [36, 50, 51]**

Το Κλασσικό Σύστημα Ρενίνης Αγγειοτασίνης (ΣΡΑ) έγινε πιο πολύπλοκο με την ανακάλυψη πεπτιδίων, πρωτεϊνών και νέων ενζυμικών μονοπατιών.

Οι καθεψίνες και οι καλλικρεΐνες μπορούν να δράσουν στο αγγειοτενσινογόνο για να το μετατρέψουν σε αγγειοτασίνη I ή αγγειοτασίνη II απευθείας.[52] Επιπλέον, υπάρχουν μονοπάτια στον καρδιαγγειακό ιστό για παραγωγή αγγειοτασίνης II από αγγειοτασίνη I που εξαρτώνται από τη χυμάση. Η χυμάση είναι πρωτεάση σερίνης που ανευρίσκεται στα εκκριτικά κοκκία των μαστοκυττάρων.[53] Η χυμάση δεν έχει καμία

δραστηριότητα στα κοκκία που είναι αποθηκευμένη, γιατί το pH στο εσωτερικό τους είναι όξινο. Μετά την επίδραση κάποιου βλαπτικού ερεθίσματος, η χυμάση απελευθερώνεται στην εξωκυττάρια ουσία όπου το pH=7,4 είναι κατάλληλο για την ενεργοποίησή της.[54] Στην κυκλοφορία του αίματος υπάρχουν ισχυροί αναστολείς της χυμάσης και επομένως η χυμάση αδρανοποιείται αμέσως μετά την απελευθέρωση της στη συστηματική κυκλοφορία. Αυτό υποδεικνύει ότι η χυμάση έχει ενζυματική δραστηριότητα μόνο τοπικά στους ιστούς. Η χυμάση διαμεσολαβεί >80% της παραγωγής αγγειοτασίνης II στην καρδιά και >60% στα αγγεία.[55] Εκτός από τη χυμάση των μαστοκυττάρων έχει βρεθεί χυμάση στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων του αρουραίου που μετατρέπει την αγγειοτασίνη I σε αγγειοτασίνη II.

Επιπλέον, νέα δεδομένα αναδεικνύουν και άλλα βιολογικά ενεργά πεπτίδια εκτός από την αγγειοτασίνη II. Έχει βρεθεί ένα ένζυμο ομόλογο του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης(ACE) το οποίο ονομάστηκε ACE2 και είναι μια καρβοξυπεπτιδάση που μετατρέπει την αγγειοτασίνη I σε αγγειοτασίνη 1-9. Το ένζυμο ACE2 παρουσιάζει πάνω από 40% ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας αμινοξέων στην καταλυτική περιοχή του με το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης.[56] Η αγγειοτασίνη 1-9 μεταβολίζεται από το ACE και άλλες ενδοπεπτιδάσες σε αγγειοτασίνη 1-7. Έχει βρεθεί ότι η αγγειοτασίνη 1-9 μπορεί να μετατραπεί σε κάποιους ιστούς σε αγγειοτασίνη II. Πιθανώς λοιπόν το ACE2 ρυθμίζει την εξαρτώμενη από το ACE παραγωγή αγγειοτασίνης II μέσω ενός μονοπατιού αποδόμησης της αγγειοτασίνης I. Η αγγειοτασίνη 1-7 μπορεί να παραχθεί απευθείας από την αγγειοτασίνη II με τη δράση του ACE2. Η αγγειοτασίνη 1-7 δρα στον υποδοχέα MAS (G-protein coupled receptor) και ασκεί αγγειοδιασταλτικές και αντι-ινωτικές δράσεις αντισταθμίζοντας τις δράσεις του άξονα ACE-αγγειοτασίνη II –AT1.[57] Παρ' όλα αυτά η δράση της αγγειοτασίνης 1-7 δεν περιορίζεται μόνο στην ανωτέρω αντισταθμιστική δράση. Στην πραγματικότητα, έχει βρεθεί ότι η γενετική απαλειφή του υποδοχέα MAS, μέσω του οποίου δρα, προκαλεί έναν πλούσιο φαινότυπο σε πειραματόζωα, που περιλαμβάνει καρδιακή δυσλειτουργία, δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, αυξημένη θρομβογένεση και διαταραχές των λιπιδίων και γλυκόζης και οδηγεί σε μια κατάσταση που προσομοιάζει

με το μεταβολικό σύνδρομο.[58] Στο νεφρό ο υποδοχέας MAS εκφράζεται ευρέως στα αγγεία, όπως το προσαγωγό αρτηρίδιο και το επιθήλιο του σωληναρίου, ειδικά του εγγύς. Ο άξονας ACE2- αγγειοτασίνη (1-7)- MAS προκαλεί διαστολή των αγγείων του νεφρού, αυξάνει τη νεφρική ροή αίματος και το ρυθμό σπειραματικής διήθησης, αναστέλλει την επαναρρόφηση νατρίου στο εγγύς και προκαλεί διούρηση.[59] Και στο επίπεδο του νεφρού, οι δράσεις του συγκεκριμένου άξονα είναι αντιφατικές. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, έχει βρεθεί αντιδιουρητική- αντινατριουρητική δράση της αγγειοτασίνης 1-7 σε πειραματόζωα που έχουν δεχθεί φόρτιση ύδατος (water - loaded animals) που τουλάχιστον μερικώς διαμεσολαμβάνεται από τον υποδοχέα MAS.[60] Αυτές οι αποκλίσεις μπορεί να ερμηνευθούν σε έδαφος διαφορετικού πειραματικού σχεδιασμού, διαφορετικών ειδών αλλά και διαφορετικής κατάστασης ενυδάτωσης.

Οι δράσεις της αγγειοτασίνης 1-7 μέσω του υποδοχέα MAS είναι αντιφατικές και στην παθοφυσιολογία νεφρικών παθήσεων. Ενδεικτικά αναφέρεται η νεφροπροστατευτική δράση της σε ένα πειραματικό μοντέλο σπειραματονεφρίτιδας όπου η χορήγηση της προκάλεσε μείωση της νεφροσκλήρυνσης.[61] Αντίθετα, σε πειραματικά μοντέλα νεφρικής ανεπάρκειας –αυτό της μονόπλευρης απόφραξης ουρητήρα και αυτό της νεφρικής βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση – διαπιστώθηκε μείωση της νεφρικής βλάβης σε πειραματόζωα με γενετική έλλειψη του υποδοχέα, MAS-/- (είχαν προκύψει από διασταύρωση πειραματοζώων στα οποία είχε προκληθεί διαγραφή του ενός μόνο γονιδίου για τον υποδοχέα MAS). Επιπλέον, τα πειραματόζωα χωρίς την έλλειψη του υποδοχέα (MAS+/+) παρουσίασαν επιδείνωση της βλάβης μετά τη χορήγηση αγγειοτασίνης 1-7.[62] Επίσης, σε ένα πειραματικό μοντέλο διαβήτη, διαπιστώθηκε ότι η χρόνια χορήγηση αγγειοτασίνης 1-7 είχε ως αποτέλεσμα την επιδείνωση της νεφρικής βλάβης.[63]

Άλλα πεπτίδια με βιολογική δραστηριότητα αποτελούν η αγγειοτασίνη III και η αγγειοτασίνη IV που προκύπτουν από τη δράση αμινοπεπτιδασών στην αγγειοτασίνη II. Η αγγειοτασίνη III αντιδρά με τους AT1 και AT2 υποδοχείς. Η αγγειοτασίνη IV προσδέεται σε έναν ειδικό υποδοχέα, τον AT4 που έχει ταυτοποιηθεί ως ρυθμιζόμενη από την ινσουλίνη αμινοπεπτιδάση και εκφράζεται ευρέως στο νεφρό, τα επινεφρίδια,

τον πνεύμονα και την καρδιά. Στο νεφρό η αγγειοτασίνη IV έχει βρεθεί ότι προκαλεί αύξηση της ροής αίματος στο φλοιό, ενώ μειώνει τη μεταφορά νατρίου σε απομονωμένα κύτταρα του εγγύς σωληναρίου του νεφρού[64, 65]

Το τρίτο μέλος της οικογένειας των μετατρεπτικών ενζύμων που απομονώθηκε ονομάστηκε κολεκτρίνη (colectrin) και έχει ισχυρή ομολογία με τη διαμεμβρανική περιοχή του ACE2 αλλά δε διαθέτει το τμήμα της καρβοξυπεπτιδάσης.[66]

### **2.5. Τοπικά Συστήματα Ρενίνης Αγγειοτασίνης (ΣΡΑ)**

Νέα δεδομένα δείχνουν την ύπαρξη τοπικών συστημάτων ρενίνης αγγειοτασίνης στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στα αιμοφόρα αγγεία, στο πάγκρεας, στο λιπώδη ιστό και στο νεφρό.[67]

Τα συστήματα αυτά λειτουργούν αυτόνομα από το συστηματικό ΣΡΑ.[51] Προϋπόθεση για να θεωρηθεί ένα σύστημα τοπικό είναι αφ' ενός να υπάρχουν στον ιστό όλα τα συστατικά του και να έχει αποδειχθεί η ύπαρξή τους σε επίπεδο mRNA και αφ' ετέρου να συμβαίνει στον ιστό παραγωγή αγγειοτασίνης II η οποία να συνδέεται με τους υποδοχείς της με αυτοκρινή (στο ίδιο κύτταρο) ή παρακρινή (στα παρακείμενα κύτταρα του ίδιου ιστού) τρόπο. Παρ' ότι κάποιο συστατικό του ΣΡΑ μπορεί να προέλθει από τη συστηματική κυκλοφορία σε έναν ιστό που υπάρχει τοπικό ΣΡΑ, η εξ' αρχής σύνθεση αγγειοτασίνης II στον ιστό και η σύνδεσή της με τους υποδοχείς της είναι βασικό χαρακτηριστικό για ένα τοπικό σύστημα ρενίνης αγγειοτασίνης. Επιπλέον, η παραγωγή της αγγειοτασίνης II θα πρέπει να ρυθμίζεται τοπικά από τον ιστό.[31]

### 2.5.1. Ενδονεφρική Εντόπιση των Συστατικών του ΣΡΑ [51]

Παρότι κάθε όργανο του σώματος διαθέτει στοιχεία του ΣΡΑ, ο νεφρός είναι μοναδικός ως προς το ότι τα συστατικά του ΣΡΑ εντοπίζονται διαμερισματοποιημένα.

- **Ρενίνη [68]**

Τα κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής έχουν αυξημένα επίπεδα σε ότι αφορά το mRNA της ρενίνης αλλά και την ίδια την πρωτεΐνη. Η ρενίνη απελευθερώνεται στην κυκλοφορία και μετατρέπει το συστηματικό αγγειοτασινογόνο σε αγγειοτασίνη I, αλλά εισέρχεται και στα διάφορα όργανα διαδραματίζοντας ρόλο στην ενεργοποίηση των τοπικών ΣΡΑ. Το mRNA της ρενίνης όπως και δραστηριότητα ρενίνης έχουν βρεθεί στο εγγύς και το άπω σωληνάριο. Επιπλέον υπάρχουν δεδομένα ότι η ρενίνη εκκρίνεται στον αυλό του άπω σωληναρίου.[69] Επίσης στα ούρα πειραματοζώων διαπιστώθηκε δραστηριότητα ρενίνης.[70]

- **Μετατρεπτικό Ένζυμο της Αγγειοτεσίνης (ΜΕΑ) [51]**

Η αγγειοτασίνη I μετατρέπεται σε αγγειοτασίνη II με τη δράση του μετατρεπτικού ενζύμου το οποίο εντοπίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Στο νεφρό, εκτός από την εντόπιση του στα αγγεία, εκφράζεται στην ψηκτροειδή παρυφή των κυττάρων του εγγύς σωληναρίου. Βέβαια, υπάρχει διαφορά στην εντόπιση του ΜΕΑ στον άνθρωπο σε σχέση με τα πειραματόζωα που ευρέως χρησιμοποιούνται. Συγκεκριμένα, στους αρουραίους υπάρχει εκτεταμένη εντόπιση του ΜΕΑ στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του νεφρού. Αντίθετα, στους νεφρούς υγιών ανθρώπων το ένζυμο εκφράζεται κυρίως στη ψηκτροειδή παρυφή του εγγύς σωληναρίου και πολύ λιγότερο στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Είναι ενδιαφέρον πως σε διάφορες παθήσεις, παρατηρείται εκ νέου έκφραση του ΜΕΑ στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του νεφρού. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε εντόπιση του ΜΕΑ στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριολίων, των σπειραματικών τριχοειδών, των ευθέων αγγείων και των φλεβών. Μάλιστα, σε ό,τι αφορά ειδικά το σακχαρώδη διαβήτη, παρατηρήθηκε νέο- εντόπιση του ΜΕΑ κυρίως στο σπείραμα.[71]

Επίσης, στο νεφρόνιο του αρουραίου το ΜΕΑ εντοπίζεται στο σωληναριακό υγρό όπως επίσης στα ούρα αλλά και στο αίμα του απαγωγού αρτηριολίου. Μάλιστα η μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας στο απαγωγό κατά 30% σε σχέση με το προσαγωγό υποδηλώνει ότι το σπείραμα διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην κάθαρση του ΜΕΑ. Ενζυμική δραστηριότητα έχει βρεθεί καθόλο το μήκος του νεφρονίου. Μάλιστα η δραστηριότητα μειώνεται όσο προχωράμε από το εγγύς σωληνάριο προς το άπω και αυξάνεται πάλι στα ούρα. Στο τελικό τμήμα του άπω σωληναρίου δεν έχει βρεθεί ενζυμική δραστηριότητα ΜΕΑ. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν έκκριση, αποδόμηση ή/και επαναρρόφηση στο εγγύς σε συνδυασμό με έκκριση στο αθροιστικό σωληνάριο.[72]

- **Αγγειοτασινολόγο[51]**

Οι νεφροί έχουν τη δυνατότητα να παράγουν αγγειοτασινολόγο. Το mRNA για το αγγειοτασινολόγο όπως επίσης και αυτή καθαυτή η πρωτεΐνη έχουν εντοπισθεί στα κύτταρα του εγγύς σωληναρίου (εσπειραμένο και ευθύ). Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η αγγειοτασίνη II που ανευρίσκεται στα σωληνάκια μπορεί να προέρχεται από το αγγειοτασινολόγο που παράγεται τοπικά. Το αγγειοτασινολόγο που παράγεται στα κύτταρα του εγγύς σωληναρίου φαίνεται ότι εκκρίνεται κατευθείαν μέσα στο σωληναριακό αυλό.[73, 74]

Μετά την έκκριση του αγγειοτασινολόγου στον αυλό του σωληναρίου, είναι δυνατόν να συμβεί σύνθεση αγγειοτασίνης I και II. Κάποια ποσότητα ρενίνης εκκρίνεται από την παρασπειραματική συσκευή και επιπλέον όπως αναφέρθηκε ανωτέρω έχει βρεθεί δραστηριότητα ρενίνης στον άπω νεφρόνα. Ήδη έχει αναφερθεί η παρουσία του μετατρεπτικού ενζύμου στην ψηκτροειδή παρυφή και στο σωληναριακό υγρό – με εξαίρεση τον άπω νεφρόνα – και στα ούρα.

Η παρουσία του αγγειοτασινολόγου στα ούρα δείχνει την παρουσία του σε όλο το μήκος του νεφρονίου και όσο υπάρχει διαθεσιμότητα ρενίνης και μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης, λαμβάνει χώρα η ενδοαυλική παραγωγή αγγειοενσίνης II.



Επιπλέον, εκτός από τις παραπάνω εντοπίσεις του αγγειοτασινογόνου στο νεφρό, πειράματα ανοσοφθορισμού έχουν δείξει θετικό σήμα στα σπειράματα (ενδοθηλιακά κύτταρα) και στα ευθέα αγγεία.[75]

- **Υποδοχείς Αγγειοτασίνης [68]**

Οι δράσεις της αγγειοτενσίνης II διαμεσολαβούνται από τους υποδοχείς της AT1 και AT2 που εκφράζονται ευρέως στο νεφρό. Το mRNA για τον AT1 υποδοχέα έχει εντοπισθεί στα εγγύς εσπειραμένα και ευθέα σωληνάρια, στο παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle, στο σπείραμα, στις αρτηρίες, στα ευθέα αγγεία και στα κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής. Στα τρωκτικά υπάρχουν 2 τύποι του AT1 υποδοχέα: AT1A και AT1B. Το mRNA και για τους δύο υποτύπους έχει βρεθεί στα αγγεία του νεφρού, στα σπειράματα και στα σωληνάρια.[76] Ο AT1A είναι ο κύριος υπότυπος στα σωληνάρια στο επίπεδο του mRNA ενώ ο AT1B κυριαρχεί έναντι του AT1A μόνο στο σπείραμα. Με πειράματα ανοσοϊστοχημείας βρέθηκε ότι η κατανομή του AT1 στο νεφρό του ενηλίκου έχει ως εξής: στην ψηκτροειδή παρυφή και στη βασικοπλάγια μεμβράνη του εγγύς σωληναρίου, στο άπω σωληνάριο, στο αθροιστικό σωληνάριο, στις νεφρικές αρτηρίες και την πυκνή κηλίδα. Σε σχέση με το σπείραμα, ο AT1 εντοπίζεται στα μεσαγγειακά κύτταρα και τα ποδοκύτταρα [77]

Ο AT2 εκφράζεται ευρέως κατά την εμβρυική ζωή στο νεφρικό μεσέγγυμα, στον άνθρωπο και τα τρωκτικά, και τα επίπεδά του μειώνονται δραματικά μετά τη γέννηση.[78] Στο νεφρό του ενηλίκου, ευρίσκεται στο εγγύς και το άπω σωληνάριο, στα αθροιστικά σωληνάρια, στο σπείραμα και τα αγγεία. [48]

- **Αγγειοτασίνη II[79]**

Τα επίπεδα της αγγειοτενσίνης II που ανιχνεύονται στο νεφρό είναι πολύ υψηλότερα από αυτά που θα ερμηνεύονταν από το ποσοστό αυτής που φθάνει στο νεφρό με την κυκλοφορία του αίματος.[80] Στο νεφρό, τα επίπεδα της αγγειοτασίνης II ρυθμίζονται με σύνθετο τρόπο και εξαρτώνται αφ' ενός από την κυκλοφορία του αίματος και αφ' ετέρου από την τοπική παραγωγή αγγειοτασίνης II αλλά και την ενδονεφρική

μετατροπή σε αγγειοτασίνη II της αγγειοτασίνης I και του αγγειοτασινογόνου που φθάνουν στο νεφρό με την κυκλοφορία του αίματος. Στους ανθρώπους έχει βρεθεί ότι το ποσοστό της αγγειοτασίνης I από τη συστηματική κυκλοφορία, που μετατρέπεται στο νεφρό σε αγγειοτασίνη II, αντιστοιχεί σε λιγότερο από 10%.[81] Επίσης, στο νεφρό είναι δυνατό να συμβεί μετατροπή σε αγγειοτασίνη II της τοπικά παραγόμενης αγγειοτασίνης I που έχει όμως προκύψει από το συστηματικό αγγειοτασινογόνο. Επιπλέον, ο νεφρός μεταβολίζει το μεγαλύτερο μέρος της αγγειοτασίνης II που προέρχεται από τη συστηματική κυκλοφορία. Συγκεκριμένα σε μια μελέτη[82] όπου χορηγήθηκε στη νεφρική αρτηρία των πειραματοζώων ραδιοσημασμένη αγγειοτασίνη II, διαπιστώθηκε ότι

- 1) το ποσοστό αποδόμησης της ραδιοσημασμένης αγγειοτασίνης II ήταν 72% στο νεφρό,
- 2) η συγκέντρωση της αγγειοτασίνης II στη νεφρική φλέβα ήταν μεγαλύτερη από αυτή που θα αναμενόταν με βάση το ποσοστό αποδόμησης της ραδιοσημασμένης αγγειοτασίνης II, κάτι που σημαίνει ότι υπάρχει ενδονεφρική παραγωγή αγγειοτασίνης II και
- 3) στο νεφρικό ιστό ανιχνεύονταν υψηλές συγκεντρώσεις αγγειοτασίνης II, όχι όμως και ραδιοσημασμένης αγγειοτασίνης II, κάτι που σημαίνει ότι η αγγειοτασίνη II της συστηματικής κυκλοφορίας δε συσσωρεύεται στο νεφρό.

Επομένως, η αγγειοτασίνη II που εντοπίζεται και ασκεί τις δράσεις της στο νεφρό είναι συνέπεια πολλών μηχανισμών.

Η κατανομή της ενδονεφρικής αγγειοτασίνης II είναι διαμερισματοποιημένη και υπάρχει διαφορά στα επίπεδα αυτής στο μυελό σε σχέση με το φλοιό. Στο φλοιό η αγγειοτασίνη II εντοπίζεται στο πειραματικό διήθημα, στο υγρό του διάμεσου χώρου και στο υγρό του αυλού των σωληναρίων.

Σε αρουραίους Wistar μετρήθηκαν τα επίπεδα αγγειοτασίνης II σε διαφορετικά ενδονεφρικά διαμερίσματα, όπως το πειραματικό διήθημα και το υγρό του αυλού του εγγυς σωληναρίου. Παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της αγγειοτασίνης II στο πειραματικό διήθημα και το σωληναρικό υγρό ήταν 1000 φορές μεγαλύτερες σε σχέση

με τη συγκέντρωσή της στη συστηματική κυκλοφορία. Αυτό υποστηρίζει τη θέση της ύπαρξης τοπικού συστήματος ρενίνης αγγειοτασίνης που λειτουργεί ανεξάρτητα από το συστηματικό. Σε ό,τι αφορά τις θέσεις παραγωγής της αγγειοτασίνης II του πειραματικού διηθήματος, αυτές πιθανώς είναι το προσαγωγό αρτηρίδιο, το απαγωγό αρτηρίδιο και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του σπειράματος.[83]

Αναφορικά με την αγγειοτασίνη II του διάμεσου χώρου, η μέτρηση των επιπέδων αυτής στη λέμφο του νεφρού, αρχικά θεωρείτο ότι αντικατόπτριζε την ποσότητα αγγειοτασίνης II στο διάμεσο χώρο. Μειονέκτημα της μέτρησης αποτελούσε ότι δεν ήταν σαφές ποιο ποσοστό της μετρούμενης αγγειοτασίνης II είχε παραχθεί μέσα σε αυτά καθεαυτά τα λεμφαγγεία τα οποία διαθέτουν ρενίνη και υποστρώμα της ρενίνης. Γι αυτό λοιπόν σε μια μελέτη σε πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα μικροδιήθησης που συνδέθηκε στο νεφρικό φλοιό.[84] Η μεμβράνη διήθησης είχε φραγμό μοριακού βάρους με αποτέλεσμα μεγάλα μόρια όπως η ρενίνη, το αγγειοτασινογόνο και διάφορα ένζυμα να μη διέρχονται του φραγμού και επομένως η αγγειοτασίνη II που διήρχετο του φραγμού και καταμετράτο αντιπροσώπευε τα επίπεδα αγγειοτασίνης II του διάμεσου χώρου. Διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση της αγγειοτασίνης II του διάμεσου χώρου ήταν αυξημένη σε σχέση με του πλάσματος και αυτό σημαίνει ότι ουσιαστικά συνεισφέρει στην υψηλή συγκέντρωση ενδονεφρικής αγγειοτασίνης II.

Σε ό,τι αφορά την αγγειοτασίνη II που ανευρίσκεται στα σωληνάρια, έχειδειχθεί ότι είναι σε nanomolar συγκεντρώσεις στο υγρό του εγγύς σωληναρίου.[85] Μάλιστα οι ερευνητές έδειξαν ότι η αγγειοτασίνη II που ανιχνεύεται στο σωληναριακό υγρό, δεν προέρχεται από τη συστηματική κυκλοφορία και επομένως από το πειραματικό διήθημα, αφού χορήγηση φυσιολογικού ορού και αύξηση του ενδαγγειακού όγκου οδήγησε σε μείωση της αγγειοτασίνης II του πλάσματος αλλά όχι αυτής του σωληναριακού αυλού. Άλλωστε είναι γνωστό ότι στον αυλό του εγγύς σωληναρίου υπάρχουν υψηλές nanomolar συγκεντρώσεις αγγειοτασίνης I και αγγειοτασίνης II και αυτό υποδεικνύει ότι η αγγειοτασίνη II είτε εκκρίνεται ήδη παραχθείσα είτε παράγεται

στον αυλό του εγγύς σωληναρίου από τη δράση του μετατρεπτικού ενζύμου της ψηκτροειδούς παρυφής στην εκκρινόμενη αγγειοτασίνη I.[86]

Σε ό,τι αφορά την αγγειοτασίνη II του μυελού στο νεφρό έχει βρεθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μικροκυκλοφορίας των αγγείων της μυελώδους μοίρας του νεφρού.[87] Τα επίπεδα της αγγειοτασίνης II είναι πιο υψηλά στο μυελό από ότι στο φλοιό,[80] όπως και η πυκνότητα των υποδοχέων αγγειοτασίνης II είναι μεγαλύτερη στο μυελό, σε σχέση με το φλοιό[88]

### **2.6.Ενδοκυτταρικά Συστήματα Ρενίνης Αγγειοτασίνης (ΣΡΑ)[89]**

Τα ενδοκυτταρικά ΣΡΑ και οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί με τους οποίους εμπλέκονται in vivo ενδεχομένως στη λειτουργία των ιστών δεν έχουν διερευνηθεί εκτενώς . Υπάρχουν δεδομένα για ύπαρξή τους σε διάφορα κύτταρα όπως είναι τα κύτταρα του μυοκαρδίου, οι ινοβλάστες, τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και τα κύτταρα του νεφρού. Το ενδοκυτταρικό ΣΡΑ χαρακτηρίζεται από τη σύνθεση και τις δράσεις της αγγειοτασίνης II που ξεκινούν μέσα στο κύτταρο. Επίσης, δράσεις που προκύπτουν μέσα στο κύτταρο από αγγειοτασίνη II, που έχει μεταφερθεί στον ενδοκυττάριο χώρο από το διάμεσο χώρο, αποτελούν μέρος του ίδιου πλαισίου.

### **3.ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ**

Η διαβητική νεφροπάθεια αποτελεί βασική αιτία τελικού σταδίου νεφρικής νόσου στο Δυτικό κόσμο. Η παθοφυσιολογία της είναι πολύπλοκη. Βασικό ρόλο στην ανάπτυξη της διαβητικής νεφροπάθειας διαδραματίζει η υπεργλυκαιμία. Όμως, υπάρχουν δεδομένα που εμπλέκουν συγκεκριμένα γονίδια στην πρόοδο της νεφρικής νόσου συνεπεία του σακχαρώδους διαβήτη.[1] Οι μεταβολικές αλλαγές και το αιμοδυναμικό stress επάγουν την απελευθέρωση πεπτιδίων, κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων που διαμεσολαβούν τις λειτουργικές διαταραχές (υπερδιήθηση) όπως επίσης και τις δομικές αλλαγές (υπερτροφία του σπειράματος, εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, ποδοκυτταρική βλάβη).

#### **3.1.Κλινική πορεία της διαβητικής νεφροπάθειας**

Η κλινική πορεία της διαβητικής νεφροπάθειας χαρακτηρίζεται από πέντε στάδια, [90] τα οποία είναι πιο σαφή στο διαβήτη τύπου 1,[91] σε σχέση με το διαβήτη τύπου 2 λόγω της λοιπής συννοσηρότητας (υπέρταση, παχυσαρκία, δυσλιπιδαιμία) που συνυπάρχει στο διαβήτη τύπου 2. Τα στάδια διαχωρίζονται με βάση τις τιμές του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, της απέκκρισης λευκωματίνης στα ούρα και της αρτηριακής πίεσης και έχουν ως εξής:

Στάδιο I: Υπάρχει φυσιολογική απέκκριση λευκωματίνης και αρτηριακή πίεση και αυξημένος GFR, χωρίς κλινικές εκδηλώσεις. [92]

Στάδιο II: Καθώς η νεφρική βλάβη εξελίσσεται, εμφανίζεται αυξημένη απέκκριση λευκωματίνης, αυξημένη αρτηριακή πίεση και GFR στα ανώτερα φυσιολογικά επίπεδα.

Στάδιο III: Υπάρχει έκδηλη πρωτεинуρία, υπέρταση και μειούμενο GFR.

Στάδιο IV: Εμφανίζεται πρωτεинуρία επιπέδων νεφρωσικού συνδρόμου, υπέρταση και μειωμένο GFR.

Στάδιο V: Κατάληξη σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο με GFR <15ml/min.

### 3.2. Παθολογοανατομικές βλάβες στη διαβητική νεφροπάθεια [1]

Η δομή του νεφρού διαταράσσεται σε όλους τους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη ακόμα και σε αυτούς που τελικά δεν θα αναπτύξουν διαβητική νεφροπάθεια. Οι πρώιμες μορφολογικές αλλαγές αφορούν την αύξηση του μεγέθους του νεφρού που συμπεριλαμβάνει σπειράματα και σωληνάκια και συμβαίνει τους πρώτους μήνες μετά την εμφάνιση του σακχαρώδους διαβήτη. Μία από τις πρώτες κυτταρικές αλλαγές στον σακχαρώδη διαβήτη είναι η υπερτροφία των μεσαγγειακών και σωληναριακών κυττάρων. Η πάχυνση της βασικής μεμβράνης σπειραμάτων και σωληναρίων αναπτύσσεται 2 με 3 χρόνια μετά. Η φυσιολογική βασική μεμβράνη αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη, φμπρονεκτίνη, εντακτίνη και πρωτεογλυκάνες. Σε ό,τι αφορά το κολλαγόνο τύπου IV, οι αλυσίδες α3,α4,α5 κυριαρχούν ενώ οι α1 και α2 υπάρχουν σε μικρές ποσότητες.[93] Τα ποδοκύτταρα δεν παράγουν μόνο στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας αλλά και πρωτεΐνες που την αποδομούν.[94] Στη διαβητική νεφροπάθεια, υπάρχει αφ' ενός αυξημένη έκφραση των αλυσίδων α3 και α4 αφ' ετέρου μειωμένη σύνθεση των α1 και α2.[93] Επίσης, έχει παρατηρηθεί μείωση της θειικής ηπαράνης [93, 95] Επομένως, στη διαβητική νεφροπάθεια, η διαταραχή στη βασική μεμβράνη του σπειράματος συνίσταται σε αλλαγή της σύνθεσής της και αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου τύπου IV που περαιτέρω οδηγούν σε αύξηση του πάχους της.[96] Το εύρος της βασικής μεμβράνης στη διαβητική νεφροπάθεια γίνεται το διπλάσιο της τιμής των υγιών μαρτύρων σύμφωνα με μελέτη σε πειραματικό μοντέλο διαβητικής νεφροπάθειας.[97] και αυτό έχει συσχετισθεί με την παρουσία πρωτεϊνουρίας σε μια μελέτη ασθενών με νεφροπάθεια από διαβήτη τύπου I.[98]

Τρία με πέντε χρόνια μετά την εμφάνιση του διαβήτη παρατηρείται αύξηση της έκτασης της μεσαγγείου ουσίας, η οποία προκαλείται από αύξηση της εναπόθεσης της εξωκυττάριας θεμελίου ουσίας και υπερτροφία των μεσαγγειακών κυττάρων.[99] Ο πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών κυττάρων δεν θεωρείται χαρακτηριστικό της διαβητικής νεφροπάθειας. Οι μοριακοί μηχανισμοί που επεξηγούν πως η υπεργλυκαιμία οδηγεί στην υπερτροφία των μεσαγγειακών κυττάρων έχουν ήδη εκτενώς μελετηθεί.[100, 101] Μεσαγγειακά κύτταρα τα οποία καλλιεργούνται σε

περιβάλλον με υψηλά επίπεδα γλυκόζης, μετά από μία μικρή περίοδο αυτοπεριοριζόμενου πολλαπλασιασμού, σταματούν στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου.[102] Αυτή η διακοπή στη φάση G1 διαμεσολαβείται από το p27kip1, έναν αναστολέα των εξαρτώμενων από τις κυκλίνες κινασών (cyclin – dependent kinases CDKs). Η είσοδος στον κυτταρικό κύκλο και η μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο εξαρτάται από την έκφραση και ενεργοποίηση των CDKs και των ρυθμιστικών τους υπομονάδων, των κυκλινών (cyclins).[103] Η δράση των cyclins/ CDKs αναστέλλεται από τους αναστολείς των CDKs που χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: INK(p15, p16, p18 και p19) και Cip/Kip( p27, p21 και p57).[104] Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης μέσω ενεργοποίησης της MAPK (mitogen – activated protein kinase) οδηγούν σε μεταμεταγραφική αύξηση της έκφρασης του p27kip1. Αυτό συμβαίνει διότι αυξάνεται ο χρόνος ημίσειας ζωής του p27kip1 λόγω της φωσφορυλίωσής του από την MAPK σε θέσεις σερίνης. [105]

Χαρακτηριστική βλάβη είναι τα οζίδια Kimmelstiel-Wilson (οζώδης σπειραματοσκλήρυνση) που προκύπτουν από την ανευρυσματική διάταση των σπειραματικών τριχοειδών και τη μεσαγγειόλυση, όμως πιο συχνή είναι η διάχυτη σπειραματοσκλήρυνση. Η εναπόθεση της εξωκυττάριας ουσίας είναι αποτέλεσμα αφ' ενός αυξημένης σύνθεσης και αφ'ετέρου μειωμένης αποδόμησης μορίων εξωκυττάριας θεμελίου ουσίας, ειδικά φμπρονεκτίνης και των αλυσίδων του κολλαγόνου α1(IV) και α2(IV).

Αν και η διαβητική νεφροπάθεια θεωρείται πρωτίστως σπειραματική πάθηση, εντούτοις παρατηρούνται αλλοιώσεις στα αγγεία, τα σωληνάκια και το διάμεσο νεφρικό ιστό. Μία από τις παθογνωμονικές βλάβες είναι η υαλίνωση του προσαγωγού και του απαγωγού αρτηριολίου. Επίσης, παρατηρούνται φλεγμονή, ίνωση, ατροφία των σωληναρίων, και νέκρωση των νεφρικών θηλών.

Η ιστολογική βλάβη στη διαβητική νεφροπάθεια ταξινομείται ιεραρχικά σε 4 διαβαθμίσεις με βάση την σπειραματική βλάβη και με ξεχωριστή εκτίμηση για το βαθμό συμμετοχής των αγγείων, των σωληναρίων και του διάμεσου νεφρικού ιστού.[106]

### **3.3. Παθογενετικοί μηχανισμοί της διαβητικής νεφροπάθειας**

#### **3.3.1. Αιμοδυναμικές αλλαγές**

Οι αιμοδυναμικές αλλαγές στο σπείραμα που ουσιαστικά αφορούν αυξημένη αιμάτωση και υπερδιήθηση, ανευρίσκονται πολύ νωρίς στην πορεία της διαβητικής νεφροπάθειας.[107] Η αύξηση στην ροή του αίματος στο σπείραμα και η αυξημένη υδροστατική πίεση στα τριχοειδή του σπειράματος προκύπτουν από μείωση της αντίστασης στο προσαγωγό και απαγωγό αρτηριόλιο και μάλιστα αυτή η μείωση είναι πιο εκσεσημασμένη στο προσαγωγό σε σχέση με το απαγωγό.

Αυτές οι αλλαγές αποδίδονται σε διαταραχή της αυτορρύθμισης στο επίπεδο του προσαγωγού αρτηριδίου.[108] Επίσης, πολλοί διαφορετικοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των προστανοϊδών, του μονοξειδίου του αζώτου (NO), του νατριουρητικού παράγοντα των καρδιακών κόλπων, της αυξητικής ορμόνης, γλυκαγόνης, ινσουλίνης και αγγειοτασίνης II, εμπλέκονται στην αυξημένη αιμάτωση και την υπερδιήθηση.[68, 109] Η αυξημένη ενδοσπειραματική πίεση συσχετίζεται με αύξηση της εναπόθεσης της μεσαγγείου ουσίας, ποδοκυτταρική βλάβη με πάχυνση της βασικής μεμβράνης και σπειραματοσκλήρυνση.

Επιπλέον, υπάρχουν παράγοντες που επάγονται από το διαβητικό μικροπεριβάλλον και επιδρούν στην αιμοδυναμική ισορροπία του σπειράματος όπως ο VEGF και ο TGF-β. Ο VEGF προκαλεί αγγειοδιαστολή και αυξημένη ροή αίματος πιθανώς μέσω της παραγωγής NO.[110] Στη διαβητική νεφροπάθεια, η υπεργλυκαιμία και η αγγειοτασίνη II εμπλέκονται στην αύξηση του TGF-β1.[111] Η ισομορφή TGF-β1 έχει βρεθεί να είναι αυξημένη σε σπειράματα διαβητικών αρουραίων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειακή δυσλειτουργία στο σακχαρώδη διαβήτη μέσω αναστολής της αύξησης του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Ca transients) στα κύτταρα των λείων μυικών ινών των αγγείων.[112] Η διαταραγμένη αιμοδυναμική ισορροπία στο σπείραμα οδηγεί σε μηχανικό stress, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στην παραγωγή κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, με συνέπεια την αυξημένη παραγωγή μεσαγγείου ουσίας.



Ως μία εναλλακτική ερμηνεία για την υπερδιήθηση στη διαβητική νεφροπάθεια, έχει προταθεί ως πρωτοπαθής αιτία η διαταραχή στην επαναρρόφηση του νατρίου στο σωληνάριο.[113] Στα πλαίσια του ανατροφοδοτικού μηχανισμού σωληναρίου και σπειράματος, η αυξημένη επαναρρόφηση χλωριούχου νατρίου (μέσω του συμμεταφορέα γλυκόζης – νατρίου) στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο ή την αγκύλη του Henle οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης μέσω της πυκνής κηλίδας.[114]

### **3.3.2.Μεταβολικές διαταραχές[1]**

Τα κύτταρα του νεφρού δεν χρειάζονται ινσουλίνη για να προσλάβουν τη γλυκόζη. Αντίθετα, χρησιμοποιούν διαμεμβρανικές πρωτείνες για να διευκολύνουν τη μεταφορά της γλυκόζης διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Η γλυκόζη διαχέεται σύμφωνα με το πρηνές συγκέντρωσης και στο σακχαρώδη διαβήτη τα ενδοκυττάρια επίπεδα γλυκόζης αυξάνονται σε ευθεία συνάρτηση με το βαθμό της υπεργλυκαιμίας. Τα υψηλά επίπεδα ενδοκυττάριας γλυκόζης αποβαίνουν τοξικά για τα κύτταρα του νεφρού, καθώς μια πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών ενεργοποιούνται όπως αυτό των πολυαλκοολών, των εξοζαμινών, της πρωτεϊνικής κινάσης C και της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου. Επίσης, η υπεργλυκαιμία έχει ως αποτέλεσμα τη μη ενζυματική γλυκοζυλίωση κυκλοφορουσών ή δομικών πρωτεϊνών, οι οποίες καθώς εναποτίθενται στο σπείραμα προκαλούν την έκφραση αυξητικών παραγόντων και ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που επιτείνουν τις σπειραματοσκληρυντικές αλλοιώσεις.

### **3.3.3.Διαβητική νεφροπάθεια και σύστημα ρενίνης αγγειοτασίνης**

Είναι τεκμηριωμένο ότι το συστηματικό ΣΡΑ είναι κατεσταλμένο στη διαβητική νεφροπάθεια. Συγκεκριμένα, σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 και νεφροπάθεια, τα επίπεδα δραστηριότητας ρενίνης πλάσματος ήταν πολύ χαμηλά σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Παρά τα χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας ρενίνης πλάσματος, η φαρμακευτική αναστολή του άξονα ρενίνης αγγειοτενσίνης είχε ως συνέπεια την

αύξηση της νεφρικής ροής στους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 σε σχέση με τους υγιείς. Αυτή η αύξηση της νεφρικής ροής ως αποτέλεσμα της φαρμακευτικής αγωγής, παρά τη χαμηλή δραστηριότητα ρενίνης πλάσματος οδήγησε στο συμπέρασμα ότι στο σακχαρώδη διαβήτη, ενδονεφρικά, υπάρχει αυξημένη παραγωγή αγγειοτασίνης II. [115]

**Σωληναριακά κύτταρα:** Σε καλλιέργειες σωληναριακών κυττάρων (εγγύς) του αρουραίου διαπιστώθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο καλλιεργητικό μέσο οδήγησαν σε αυξημένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του αγγειοτασινογόνου και μάλιστα αυτό φάνηκε ότι διαμεσολαβείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης C.[116]

Σε μια άλλη μελέτη, πάλι σε καλλιέργειες κυττάρων του εγγύς σωληναρίου σε συνθήκες που προσομοιάζουν το διαβητικό περιβάλλον διαπιστώθηκε ότι το mRNA του αγγειοτασινογόνου ήταν αυξημένο. Το αποτέλεσμα αυτό αποτρεπόταν με αντιοξειδωτικές ουσίες, κάτι που σημαίνει ότι η αύξηση του αγγειοτασινογόνου διαμεσολαβείται εν μέρει από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species) που προκαλούν αύξηση του οξειδωτικού stress.[117]

**Σπείραμα:** Επιπλέον, υπάρχουν δεδομένα από πειραματικά μοντέλα που υποδεικνύουν ότι τα πειραματικά επίπεδα αγγειοτασίνης II είναι πολύ υψηλότερα σε σχέση με αυτά που θα αναμένονταν από τη μέτρηση των κυκλοφορούντων συστατικών του ΣΡΑ. Συγκεκριμένα, σε διαβητικούς αρουραίους χωρίς ινσουλινοθεραπεία, παρά τα χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας ρενίνης πλάσματος, διαπιστώθηκε χαμηλή πυκνότητα υποδοχέων της αγγειοτασίνης II. Βασιζόμενοι στη αντίστροφη σχέση συγκέντρωσης αγγειοτασίνης II και της πυκνότητας των υποδοχέων της, κανείς μπορεί να συμπεράνει ότι τα πειραματικά επίπεδα αγγειοτασίνης II σε αυτά τα πειραματόζωα πρέπει να είναι αυξημένα και να οδηγούν στη μείωση των υποδοχέων τοπικά.[118]

Σε άλλο πειραματικό μοντέλο σακχαρώδους διαβήτη, παρατηρήθηκε μείωση των πειραματικών υποδοχέων της αγγειοτασίνης II, υποδηλώνοντας αυξημένα ενδοσπειραματικά επίπεδα αγγειοτασίνης II.[119]

Σε βιοψίες ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη και νεφροπάθεια, έχει βρεθεί με ανοσοϊστοχημεία αυξημένη έκφραση του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Αυτή η αυξημένη εντόπιση του ΜΕΑ στα σπειράματα των διαβητικών ασθενών, προφανώς ερμηνεύει την αυξημένη δραστηριότητα του ενδονεφρικού ΣΡΑ στο διαβήτη.[120]

Σε καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα αγγειοτασινογόνου, αγγειοτασίνης I και αυξημένη σύνθεση αγγειοτασίνης II. Επιπλέον διαπιστώθηκε αυξημένη σύνθεση αγγειοτασίνης II μετά από εξωγενή χορήγηση αγγειοτασίνης 1-9 στις καλλιέργειες, σε συνθήκες αυξημένης γλυκόζης.[121]

Προς επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων, έρχεται και η ακόλουθη μελέτη, όπου μεσαγγειακά κύτταρα του αρουραίου, που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υψηλών επιπέδων γλυκόζης, παρουσίασαν αύξηση στην παραγωγή της αγγειοτασίνης II.[122]

Διαβητικοί αρουραίοι και οι αντίστοιχοι μάρτυρές τους παρατηρήθηκαν από τη 12<sup>η</sup> έως την 24<sup>η</sup> εβδομάδα ζωής και διαπιστώθηκε σταδιακή αύξηση του αγγειοτασινογόνου και της αγγειοτασίνης II σε σπειράματα και σωληνάρια των διαβητικών πειραματοζώων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι σταδιακά αυξάνονταν τα επίπεδα ισοπροστανίου-8 (δείκτης ενδονεφρικού οξειδωτικού stress) στα ούρα των διαβητικών αρουραίων. Αυτά τα δεδομένα, σε συνδυασμό με μορφολογικές βλάβες ενδεικτικές της διαβητικής νεφροπάθειας, υποδηλώνουν ότι ο άξονας ενεργές ρίζες οξυγόνου/ αγγειοτασινογόνο/ αγγειοτασίνη II διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της διαβητικής νεφροπάθειας. [123]

Σε σπειράματα αρουραίων που έγιναν διαβητικοί με τη χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης, διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα αγγειοτασινογόνου και αγγειοτασίνης II, σε σχέση με τις αντίστοιχες μετρήσεις για τους υγιείς μάρτυρες. Η εξωγενής χορήγηση αγγειοτασίνης I στα σπειράματα οδηγούσε σε αυξημένη σύνθεση αγγειοτασίνης II στα σπειράματα διαβητικών πειραματοζώων. Η εξωγενής χορήγηση αγγειοτασίνης 1-9 είχε ως συνέπεια την αυξημένη σύνθεση αγγειοτασίνης II στα διαβητικά σπειράματα σε σχέση με τα υγιή. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η αυξημένη αγγειοτασίνη II

στο σακχαρώδη διαβήτη οφείλεται αφ' ενός στην αύξηση του αγγειοτασινογόνου και αφ' ετέρου στην αυξημένη μετατροπή άλλων πεπτιδίων. [124]

Επίσης, σε μια μελέτη όπου εξετάστηκαν βιοψίες ασθενών με νεφροπάθεια από διαβήτη τύπου 2 διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση χυμάσης, σε επίπεδο πρωτεΐνης, στο σπείραμα στους διαβητικούς σε σχέση με τους υγιείς, υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν και μη εξαρτώμενα από το ΜΕΑ μονοπάτια στην παραγωγή της ενδονεφρικής αγγειοτασίνης II στη διαβητική νεφροπάθεια. [125]

Τα ποδοκύτταρα εκφράζουν AT1 και αποτελούν θέση δράσης της αγγειοτασίνης II.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της αυξημένης σηματοδότησης από την αγγειοτασίνη II μέσω του AT1 στα ποδοκύτταρα, δημιουργήθηκε ένα διαγονιδικό μοντέλο αρουραίου που υπερέκφραζε τον AT1 στα ποδοκύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι τα ποδοκύτταρα παρουσίαζαν ψευδοκύστες και απώλεια των ποδικών προσεκβολών. Η βλάβη προοδευτικά κατέληγε σε εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση. Οι δομικές βλάβες συσχετίζονταν σημαντικά με την απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα. Επομένως, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η αυξημένη ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω του AT1 οδηγεί σε διαταραχή του ηθμού διήθησης και απώλεια λευκωματίνης στα ούρα και σοβαρές δομικές βλάβες. [126]

Επιπλέον, σε ότι αφορά τα ποδοκύτταρα, έχει βρεθεί ότι το περιβάλλον αυξημένης γλυκόζης προκαλεί αύξηση της παραγωγής αγγειοτασίνης II στα ποδοκύτταρα ως συνέπεια της αύξησης της έκφρασης του αγγειοτασινογόνου. Σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων σε διαβητικές συνθήκες, διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση πρωτεΐνης και mRNA αγγειοτασινογόνου, σε σχέση με ποδοκύτταρα καλλιεργημένα σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης. [1] Αυτό συνδυάστηκε με αυξημένη αγγειοτασίνη II και αύξηση στην έκφραση, σε επίπεδο πρωτεΐνης και γονιδίου, του υποδοχέα AT1 σε ποδοκύτταρα σε συνθήκες αυξημένης γλυκόζης. Παράλληλα, τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σε ένα πειραματικό μοντέλο διαβήτη (επαγόμενο από τη στρεπτοζοτοκίνη) όπου τα ενδοσπειραματικά επίπεδα αγγειοτασινογόνου και AT1 στα διαβητικά πειραματόζωα ακολούθησαν την τάση αυτών των ποδοκυττάρων σε συνθήκες που προσομοιάζουν το σακχαρώδη διαβήτη. Σε ό,τι αφορά την πρωτεΐνη, με

τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, διαπιστώθηκε ότι το θετικό σήμα για αγγειοτασινογόνο και AT1 υποδοχέα ήταν πιο ισχυρό στα ποδοκύτταρα των διαβητικών αρουραίων σε σχέση με τα μεσαγγειακά κύτταρα. Επίσης η πρωτεϊνουρία και η δίοδος των πρωτεϊνών από τον ηθμό διήθησης ενεργοποιεί περαιτέρω την παραγωγή αγγειοτασίνης II από τα ποδοκύτταρα. Ακόμα, το μηχανικό stress προκαλεί στα ποδοκύτταρα αυξημένη σύνθεση αγγειοτασίνης II.[127]

Σε πειραματικό μοντέλο διαβητικής νεφροπάθειας, διαπιστώθηκε πως η χορήγηση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της μορφολογίας των ποδοκυττάρων στα διαβητικά πειραματόζωα που ελάμβαναν τον αναστολέα ΜΕΑ, σε σχέση με τους αντίστοιχους διαβητικούς μάρτυρες που παρουσίαζαν υπερτροφία των ποδοκυττάρων.[128]

Επίσης σε πειραματικό μοντέλο διαβητικής νεφροπάθειας, διαπιστώθηκε πως σε διαβητικούς αρουραίους η χορήγηση αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου αφ' ενός μείωσε την πρωτεϊνουρία, αφ' ετέρου αποκατέστησε στο επίπεδο του mRNA τα επίπεδα της πρωτεΐνης του ηθμού διήθησης νεφρίνης. [129]

### **3.3.4.ΣΡΑ και διαμεσολάβηση της νεφρικής βλάβης στο σακχαρώδη διαβήτη**

Η ενεργοποίηση του ΣΡΑ στο νεφρό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαμεσολάβηση της νεφρικής βλάβης.[1]

**Φλεγμονώδης Απάντηση:** Έχει βρεθεί ότι το ΣΡΑ προκαλεί αυξημένη συγκέντρωση των μακροφάγων. Συγκεκριμένα, σε βιοψίες ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια έχει παρατηρηθεί αυξημένη διήθηση του σπειράματος, των σωληναρίων και του διάμεσου νεφρικού χώρου από μονοκύτταρα.[1] Στη διαβητική νεφροπάθεια, προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως IL-1, IL-6, IL-18, όπως επίσης και TNF-alpha εμπλέκονται στην ανάπτυξη και πρόοδο της νόσου.[130]

Η βλαπτική επίδραση της αγγειοτασίνης II σε ότι αφορά τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες διαπιστώθηκε σε μία μελέτη ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια, όπου η χορήγηση ενός αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της πρωτεϊνουρίας, την αύξηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, όπως επίσης και

τη μείωση της απέκκρισης στα ούρα της MCP-1. Επειδή η MCP-1 αυξάνει τη μετανάστευση μονοκυττάρων και τη διαφοροποίηση τους σε μακροφάγα που οδηγεί σε αύξηση της εναπόθεσης εξωκυττάριας θεμελίου ουσίας, η φαρμακολογική μείωση της αγγειοτασίνης II πιθανώς ασκεί τις ευεργετικές της δράσεις μέσω της καταστολής του MCP-1 στο νεφρό.[130, 131]

**VEGF:** Όπως έχει ήδη σημειωθεί ανωτέρω, ο VEGF είναι αυξημένος στα πρώιμα, τουλάχιστον, στάδια του σακχαρώδους διαβήτη, ειδικά στα ποδοκύτταρα και εμπλέκεται στην παθογένεση της πρωτεϊνουρίας. Η αγγειοτασίνη II έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στο σηματοδοτικό καταρράκτη του VEGF στα ποδοκύτταρα. Συγκεκριμένα σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων στις οποίες γινόταν επώαση με αγγειοτασίνη II παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση πρωτεΐνης και mRNA του VEGF. Επιπλέον βρέθηκε ότι η αύξηση του VEGF εξαιτίας της αγγειοτασίνης II διαμεσολαβείται από το μονοπάτι p38 MAPK.[132]

**TGF-β:** Τα υψηλά επίπεδα ενδονεφρικής αγγειοτασίνης II, προκαλούν ενεργοποίηση του μονοπατιού του TGF-β, που είναι ο τελικός κοινός διαμεσολαβητής που οδηγεί στις υπερτροφικές και σκληρυντικές βλάβες στη διαβητική νεφροπάθεια. Η υπερέκφραση του TGF-β έχει εντοπισθεί στο σπείραμα και το διάμεσο νεφρικό ιστό διαβητικών πειραματοζώων. Ο TGF-β διεγείρει τη σύνθεση μορίων της εξωκυττάριας ουσίας συμπεριλαμβανομένων του κολλαγόνου τύπου I, του κολλαγόνου τύπου IV, της λαμίνης και της φιβρονεκτίνης. Επιπλέον, αναστέλλει την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας με το να αναστέλλει τις πρωτεάσες αλλά και να ενεργοποιεί αναστολείς των πρωτεασών, όπως τον PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor -1/ Αναστολέας-1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου). Επιπροσθέτως, προάγει την αλληλεπίδραση των κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία, μέσω ενεργοποίησης των ιντεγκρινών.[133] Σε καλλιέργεια μεσαγγειακών κυττάρων του αρουραίου, που επώασθηκαν με αγγειοτασίνη II, διαπιστώθηκε ότι αυξήθηκε η σύνθεση μορίων της θεμέλιας ουσίας μέσω της ενεργοποίησης του TGF-β.[134]

Σε μελέτες ασθενών με διαβήτη τύπου 1, επιβεβαιώθηκε ότι η ενεργοποίηση του ΣΡΑ λόγω της υπεργλυκαιμίας προκαλεί ενεργοποίηση του TGF-β1, ο οποίος με τη σειρά

του διαμεσολαβεί τη νεφρική βλάβη στο σακχαρώδη διαβήτη. Διαπιστώθηκε ότι η καπτοπρίλη μειώνει τα επίπεδα του TGF-β1 και ασκεί προστατευτική δράση στο νεφρό.[135]

### 3.3.5 TGF-β

Ο TGF-β αποτελεί τον τελικό κοινό διαμεσολαβητή πολλών παραγόντων ως συνέπεια της υπεργλυκαιμίας και οδηγεί σε αύξηση της εξωκυττάριας θεμελίου ουσίας, σπειραματοσκλήρυνση και νεφρική ανεπάρκεια στο διαβήτη[133] Σε μια σειρά από μελέτες, έχει παρατηρηθεί ότι το σύστημα του TGF-β έχει αυξημένη δραστηριότητα στα κύτταρα του νεφρού όταν εκτίθενται σε περιβάλλον με αυξημένα επίπεδα γλυκόζης. Συγκεκριμένα, σε καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων σε καλλιεργητικό υλικό με αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης, αυξήθηκαν τα επίπεδα πρωτεΐνης, αλλά και mRNA του TGF-beta1.[136] Επιπλέον, σε δύο πειραματικά μοντέλα ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη, αυτά του biobreeding (BB) αρουραίου και nonobese diabetic (NOD) ποντικίου, υπήρχαν αυξημένη έκφραση mRNA και πρωτεΐνης του TGF-beta1 στο νεφρό, παράλληλα με την εμφάνιση της νεφρικής υπερτροφίας. [137] Η αυξημένη έκφραση του TGF-β συσχετιζόταν με την ταυτόχρονη αύξηση στην έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας (fibronectin, tenascin, και η πρωτεογλυκάνη biglycan) που επάγονται από τον TGF-β. Παράλληλα με την αυξημένη έκφραση του TGF-β έχει διαπιστωθεί αυξημένη έκφραση του υποδοχέα τύπου II του TGF-beta σε νεφρικό φλοιό πειραματοζώων με σακχαρώδη διαβήτη.[138] Εξάιρεση στη δράση του TGF-β στη διαβητική νεφροπάθεια αποτελεί η πρόκληση της λευκωματινουρίας.[139] Έχει βρεθεί, ότι η χορήγηση αντισώματος έναντι του TGF-β σε ποντίκια db/db (που αποτελεί πειραματικό μοντέλο σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 προλαμβάνει τη μεσαγγειακή υπερτροφία, αλλά και την αυξημένη έκφραση σε επίπεδο mRNA της fibronectin και άλφα1(IV) κολλαγόνου στο νεφρό, αλλά δεν ασκεί καμία επίδραση στη λευκωματινουρία.

### **3.4.Πρωτεϊνουρία στη διαβητική νεφροπάθεια**

Η αύξηση της απέκκρισης της λευκωματίνης είναι η πρώτη ανιχνεύσιμη κλινική βλάβη στη διαβητική νεφροπάθεια.[140]

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο διαβήτη τύπου 1 υπάρχει μια κλινικά λανθάνουσα περίοδος αρκετών χρόνων που χαρακτηρίζεται μόνο από αύξηση του μεγέθους του νεφρού και αύξηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης. Εν συνεχεία, σε αυτούς τους διαβητικούς ασθενείς (περίπου 30%) που είναι γενετικά προδιατεθειμένοι να αναπτύξουν διαβητική νεφροπάθεια, εμφανίζεται η αυξημένη απέκκριση λευκωματίνης ως πρώτη κλινική εκδήλωση της πάθησης. Αν δε χορηγηθεί θεραπευτική αγωγή, υπάρχει εξέλιξη σε πρωτεϊνουρία, συχνά επιπέδων νεφρωσικού συνδρόμου και τελικά σε νεφρική ανεπάρκεια.

Οι παθοφυσιολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στο μεσαγγειακό κύτταρο, είχαν θεωρηθεί ως το κέντρο της βλάβης στη διαβητική νεφροπάθεια. Νέα δεδομένα απομακρύνουν από τη μεσαγγειοκεντρική προσέγγιση και εμπλέκουν το ποδοκύτταρο ως πρώιμο και κεντρικό ρυθμιστή των εκδηλώσεων της διαβητικής σπειραματοπάθειας.[96, 141] Το ποδοκύτταρο τίθεται κεντρικός στόχος των επιδράσεων του διαβητικού περιβάλλοντος στην ανάπτυξη της πρωτεϊνουρίας.[142] Στη διαβητική νεφροπάθεια, τα ποδοκύτταρα υφίστανται μια σειρά από αλλαγές. Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη ασθενών με διαβήτη τύπου I που παρακολούθηθηκαν από την εφηβεία έως αργά την ενήλικη ζωή τους παρατηρήθηκε μείωση των ποδοκυττάρων και αυτό συσχετίστηκε με την λευκωματινουρία.[143] Συναφή είναι και τα ευρήματα από βιοψίες νεφρού Ινδιάνων Pima με διαβήτη τύπου II.[144] Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες είναι οι παρατηρήσεις από τη μελέτη ESPRIT (European Study for the Prevention of Renal Disease in Type 1 Diabetes) η οποία διενεργήθηκε σε ασθενείς με διαβήτη τυπου I και δε διαπιστώθηκε μεταβολή του αριθμού των ποδοκυττάρων σε ασθενείς με διαβήτη εν συγκρίσει με τους υγιείς μάρτυρες.[145]



Επιπλέον, σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I, έχει παρατηρηθεί αύξηση του εύρους των ποδικών προσεκβολών και αυτό βρέθηκε να συσχετίζεται με την λευκωματινουρία.[146]

Ο VEGF-A που παράγεται από τα ποδοκύτταρα, πιθανώς εμπλέκεται στην λευκωματινουρία στη διαβητική νεφροπάθεια. Η υπεργλυκαιμία προκαλεί αυξημένη σύνθεση VEGF-A.[147] Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I, υπάρχουν αυξημένα επίπεδα VEGF στον ορό και μάλιστα συσχετίζονται με τα επίπεδα απέκκρισης λευκωματίνης στα ούρα.[148] Η χορήγηση αντισώματος για τον VEGF σε πειραματικό μοντέλο διαβήτη τύπου I και τύπου II, είχε ως αποτέλεσμα την πρόληψη της λευκωματινουρίας.[149, 150]

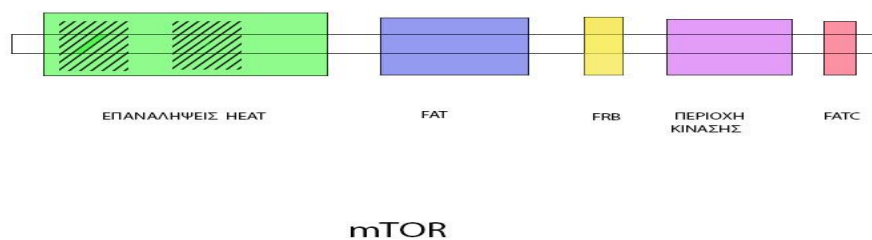


## **4.ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ PI3K-Akt-mTOR**

### **4.1.mTOR[151, 152]**

Η ραπαμυκίνη είναι μια ουσία που απομονώθηκε από το βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus* από δείγματα του εδάφους του νησιού Rapa Nui (Easter Island, νησί του Πάσχα) και διαθέτει όχι μόνο αντιμηκυτιασική δράση αλλά και ανασταλτική του πολλαπλασιασμού των κυττάρων δράση.[153] Η ραπαμυκίνη έχει πάρει έγκριση για χρήση στη θεραπευτική ως ανοσοκατασταλτικό στη μεταμόσχευση οργάνων και ως χημειοθεραπευτικό. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που προκαλείται από τη ραπαμυκίνη βρέθηκε ότι διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη TOR (target of rapamycin), μια κινάση σερίνης- θρεονίνης. Η ραπαμυκίνη μετά την είσοδό της στα κύτταρα, συνδέεται με μια μικρή πρωτεΐνη- υποδοχέα που ονομάζεται FKBP 12 και το σύμπλοκο αυτό αντιδρά με τη TOR και παρεμβαίνει στη δράση της TOR στην υπερτροφία και υπερπλασία των κυττάρων. Στους μύκητες της ζύμωσης υπάρχουν δύο πρωτεΐνες TOR. Στα θηλαστικά υπάρχει μία μόνο πρωτεΐνη TOR των 290 kDa, η οποία ονομάστηκε mTOR (mammalian target of rapamycin) και ανήκει στην οικογένεια των κινασών που σχετίζονται με την PI3K (phosphatidylinositol 3- kinase). Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες- μέλη διευκολύνουν την ικανότητα του οργανισμού να διαχειρίζεται ερεθίσματα που αφορούν μεταβολικό, περιβαλλοντικό και γενετικό stress. Η mTOR είναι, εξελικτικά συντηρημένη ανάμεσα στα είδη και αυτό υπογραμμίζει τον καθοριστικό της ρόλο στο κύτταρο. Αποτελεί μέρος δύο πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 υπεύθυνα για διακριτές κυτταρικές λειτουργίες. Η mTOR δομικά έχει 20 τυχαίες επαναλήψεις περιοχών HEAT στην αμινοτελική περιοχή, ακολουθούμενες από μια περιοχή FAT. (Εικ 6) Εν συνεχεία υπάρχει η περιοχή FRB που είναι ουσιαστικά η περιοχή πρόσδεσης του συμπλόκου της ραπαμυκίνης και του ενδοκυττάρου υποδοχέα της. Μετά υπάρχει η περιοχή της κινάσης και τέλος στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζεται η περιοχή FATC (FAT C- terminus). Οι επαναλήψεις HEAT έχουν δομή α- έλικας που προσδίδει σε μια μεγάλη επιφάνεια της πρωτεΐνης υδρόφοβες περιοχές που χρησιμεύουν για τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Επίσης, διαμεσολαβούν την εντόπιση της πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματική

μεμβράνη και συνεισφέρουν στη δημιουργία των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2.[154] Η περιοχή FAT εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Η FATC στην οξειδωμένη της μορφή παρουσιάζει ένα δομικό μοτίβο από α- έλικα και ένα καρβοξυτελικό άκρο με μία αγκύλη δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα σε δύο εξελικτικά συντηρημένες κυστεΐνες (Cys2460 και Cys2467). Σε φάση αναγωγής, η ευελιξία της περιοχής της αγκύλης αυξάνει δραματικά. Έχει διαπιστωθεί ότι το ενδοκυττάριο οξειδοαναγωγικό δυναμικό επηρεάζει το ενδοκυττάριο ποσό της mTOR μέσω της περιοχής FATC. Επειδή το mRNA της mTOR δεν αλλάζει, η κατάσταση οξειδοαναγωγής του δισουλφιδικού δεσμού φαίνεται να επηρεάζει την αποδόμηση της mTOR.[155]



**Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της δομής της κινάσης mTOR**

#### 4.2.Κινάση των φωσφο-ινοσιτιδίων-3-OH (PI3K)

Τα λιπίδια των μεμβρανών δεν έχουν αποκλειστικά δομικό ρόλο, αλλά εμπλέκονται και στη σηματοδότηση. Η 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PIP2) της κυτταρικής μεμβράνης είναι υπόστρωμα για τις κινάσες των φωσφο-ινοσιτιδίων-3-OH (PI3K) οι οποίες φωσφορυλιώνουν την ομάδα υδροξυλίου στη θέση 3 του δακτυλίου της ινοσιτόλης. Οι PI3Ks χωρίζονται σε τρεις τάξεις: I, II και III. Οι PI3Ks τάξης I χωρίζονται περαιτέρω σε IA και IB. Οι κινάσες της τάξης IA αποτελούνται από την p110 καταλυτική υπομονάδα (α, β και δ) που προσδέεται σε μία από τις ρυθμιστικές υπομονάδες που κωδικοποιούνται από τρία διαφορετικά γονίδια. Το γονίδιο Pik3r1

κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες p85α, p50α και p55α. Το γονίδιο *Pik3r2* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p85β ενώ το *Pik3r3* την πρωτεΐνη p55γ. Η μοναδική PI3K της τάξης IB αποτελείται από την καταλυτική υπομονάδα p110γ και τη ρυθμιστική υπομονάδα p101.[156, 157]

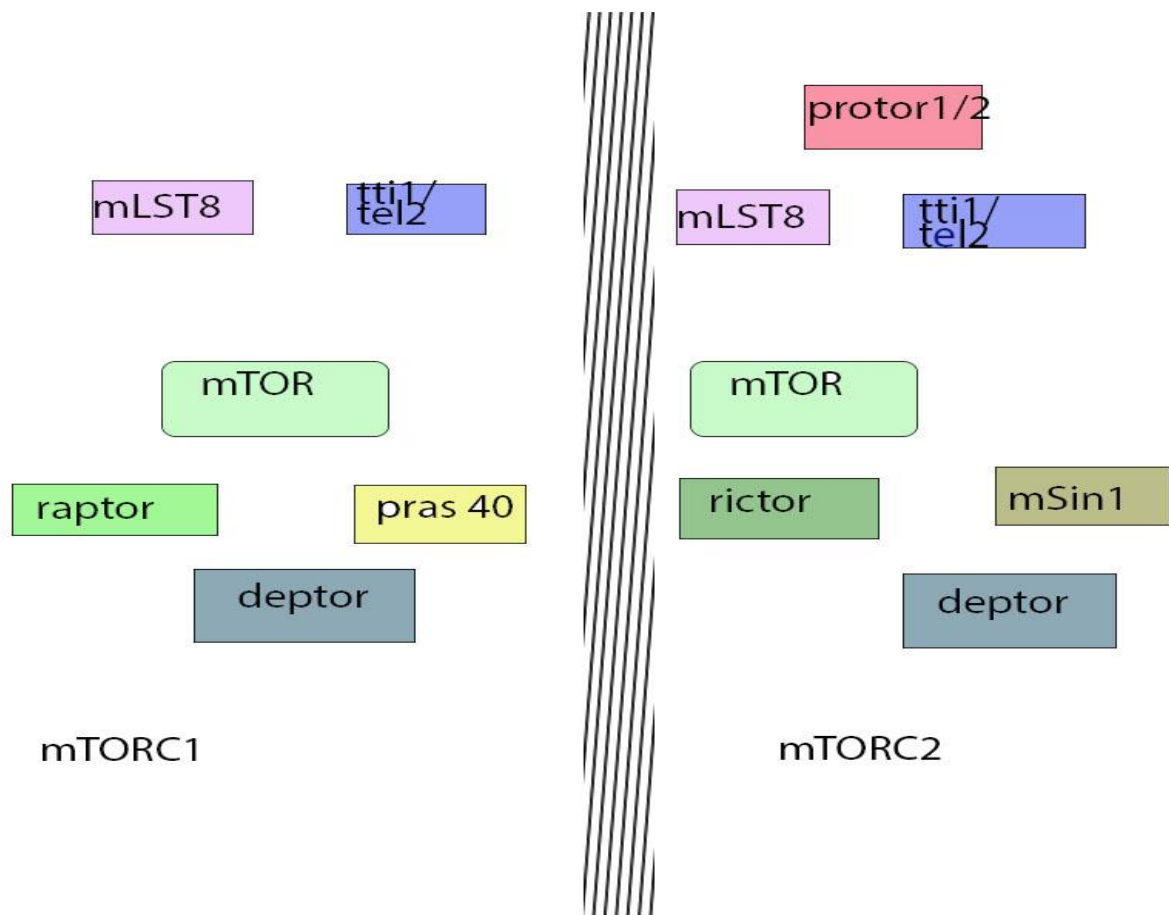
### **4.3.Κινάση AKT**

Η AKT είναι μια σερίνη- θρεονίνη κινάση, γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B (PKB) και ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών AGC (cAMP dependent, cGMP dependent, and protein kinase C). Η κινάση AKT είναι κομβικό σημείο στο κύτταρο σε ό,τι αφορά τη σηματοδότηση μετά από την επίδραση αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και άλλων ερεθισμάτων. Τα κύτταρα των θηλαστικών εκφράζουν τρεις ισομορφές της AKT (AKT1, AKT2, AKT3 ή PKBα/β/γ) που κωδικοποιούνται από 3 διαφορετικά γονίδια. Οι ισομορφές της AKT έχουν υψηλά συντηρημένες περιοχές: ένα αμινο- τελικό άκρο με την περιοχή pleckstrin homology (PH), μια περιοχή κινάσης και το καρβοξυ- τελικό ρυθμιστικό άκρο που διαθέτει την υδρόφοβη περιοχή (hydrophobic motif). Όπως θα αναφερθεί εκτενέστερα παρακάτω, στην κυτταρική μεμβράνη, η ενεργός κινάση των φωσφοϊνοσιτιδίων (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) μετατρέπει την 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PIP2) της κυτταρικής μεμβράνης σε 3,4,5 τριφωσφορική φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PIP3). Η PIP3 προσελκύει στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της pleckstrin homology την AKT η οποία φωσφορυλιώνεται στη θέση T308 (threonine 308) από την PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1).[158] Η PDK1 προσελκύεται επίσης στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της αλληλεπίδρασης της περιοχής pleckstrin homology που διαθέτει με την PIP3.[159] Η AKT φωσφορυλιώνεται επίσης στην υδρόφοβη θέση S473 (serine 473) από την PDK2 η οποία αποδείχθηκε ότι πρόκειται για το mTORC2.[160] Η φωσφορυλίωση της AKT στη S473 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας της AKT πέντε φορές.

#### 4.4.mTORC1[151, 161, 162]

Οι βασικές λειτουργίες του mTORC1 αφορούν στη ρύθμιση της αύξησης του μεγέθους των κυττάρων, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τελικά της επιβίωσης με το να αντιδρά σε ερεθίσματα που σχετίζονται με αυξητικούς παράγοντες και την κατάσταση ενέργειας και θρεπτικών συστατικών του κυττάρου.

Το mTORC1 (Εικ 7) απαρτίζεται από τις εξής πρωτεΐνες: mTOR που είναι ουσιαστικά η καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου, Raptor ( regulatory- associated protein of mTOR), mlST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), PRAS40 Deptor (DEP-domain- containing mTOR- interacting protein) και Tti1/Tel2 . Το mTORC1 έχει βρεθεί ότι είναι ευαίσθητο στην αναστολή που προκαλείται από τη δράση της ραπαμυκίνης. Ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρούν τα συστατικά του mTORC1 δεν είναι σαφής. Η Raptor είναι μια μη-ενζυματική υπομονάδα του συμπλόκου με μοριακό βάρος 150 kDa, και διαθέτει μια συντηρημένη αμινοτελική περιοχή που ακολουθείται από τρεις επαναλήψεις HEAT και επτά επαναλήψεις WD40. Δεν είναι σαφές αν ασκεί θετικό ή αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο στο σύμπλοκο, όμως είναι γεγονός ότι είναι απαραίτητη ώστε η mTOR να φωσφορυλιώνει τους στόχους της, S6K1 και 4EBP1. Επιπλέον επιδρά στη δραστηριότητα του συμπλόκου με το να ρυθμίζει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών και με το να προσελκύει υποστρώματα για την mTOR. Η αλληλεπίδραση mTOR και Raptor είναι δυναμική. Η θεραπεία με ραπαμυκίνη αναστέλλει τη λειτουργία της mTOR και την περαιτέρω σηματοδότηση με το να μειώνει την αλληλεπίδρασή της με τη Raptor. [163] Ο ρόλος της mlST8 στο σύμπλοκο δεν είναι διασαφηνισμένος. Οι υπομονάδες PRAS40 και Deptor είναι αρνητικοί ρυθμιστές της λειτουργίας του mTORC1. Η PRAS40 έχει διαπιστωθεί ότι προσδένεται στη Raptor μέσω του TOS motif.[164] Ρυθμίζει τη δραστηριότητα της κινάσης του mTORC1, άμεσα παρακωλύοντας την πρόσδεση των υποστρωμάτων 4EBP1 και S6K1 στη Raptor μέσω TOS motif[165] Οι πρωτεΐνες Tti1 και Tel2 προσφάτως ταυτοποιήθηκαν και είναι σημαντικές για την σταθερότητα και τη διατήρηση της λειτουργικότητας του mTORC1.[166]

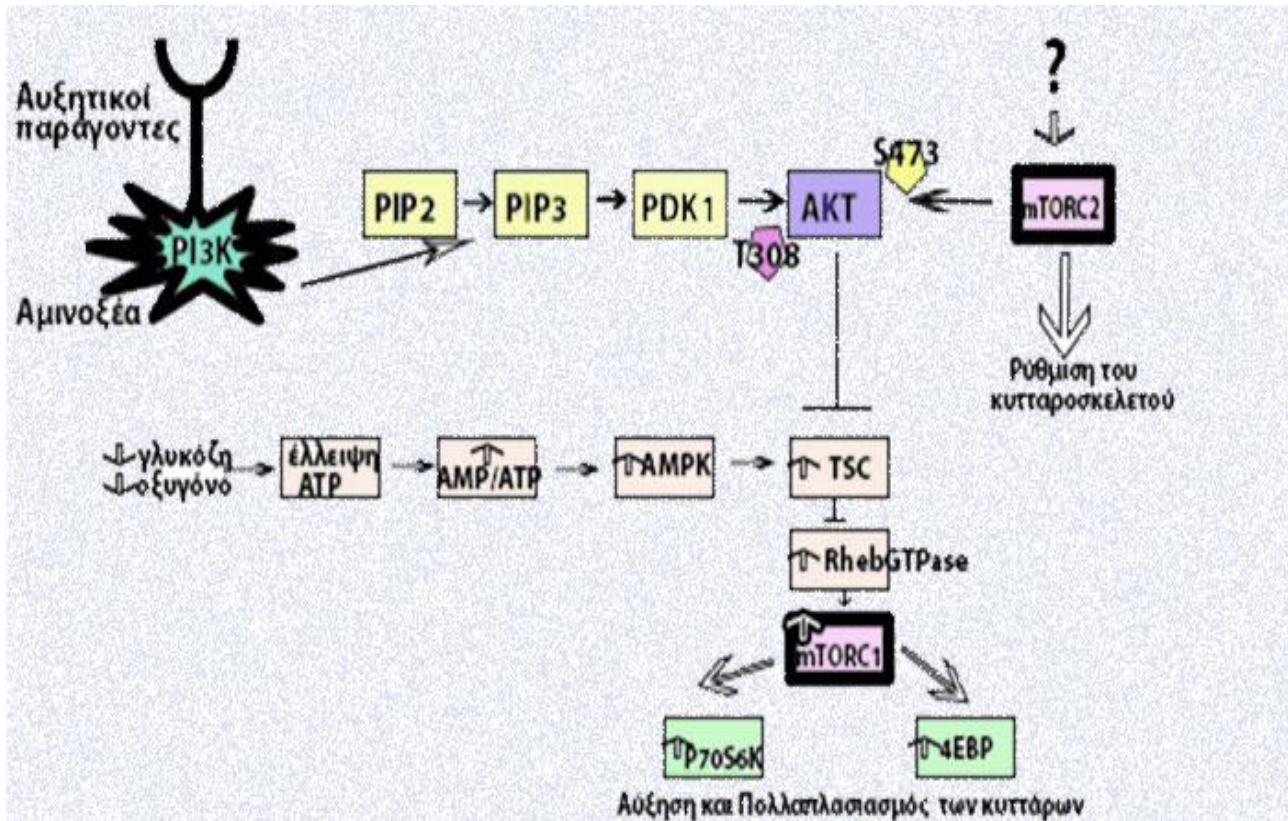


**Εικόνα 7 Σύμπλοκα mTOR.** Η κινάση mTOR αποτελεί τον πυρήνα δύο πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που ονομάζονται mTORC1 και mTORC2. Το mTORC1 είναι ευαίσθητο στη δράση της ραπαμυκίνης και δέχεται είσοδο από ερεθίσματα που αφορούν επάρκεια σε αμινοξέα και ενέργεια. Ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση των κυττάρων, επάγοντας ή αναστέλλοντας αναβολικές ή καταβολικές διεργασίες αντίστοιχα. Το mTORC2 δέχεται είσοδο από αυξητικούς παράγοντες και εμπλέκεται στη ρύθμιση της ακτίνης του κυτταροσκελετού. Σε οξεία επίδραση της ραπαμυκίνης δεν είναι ευαίσθητο. Αντίθετα η παρατεταμένη επίδραση της ραπαμυκίνης δύναται να διασπάσει τη δομή του mTORC2.

#### 4.5.Ρύθμιση του mTORC1 (Εικ 8) [152, 167, 168]

Το mTORC1 αποτελεί έναν αισθητήρα του κυττάρου για επάρκεια σε παράγοντες και συνθήκες απαραίτητων για την κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό. Επομένως δέχεται πληροφορία από αυξητικούς παράγοντες όπως ο EGF (epidermal growth factor) αλλά και θρεπτικά στοιχεία όπως η γλυκόζη, τα αμινοξέα και το οξυγόνο. Όλα αυτά τα ερεθίσματα μετουσιώνονται τελικά είτε σε αύξηση είτε σε μείωση της ενεργότητας του

mTORC1 και όλη αυτή η λεπτή ρύθμιση επιτυγχάνεται μέσω μιας σειράς σηματοδοτικών γεγονότων.



**Εικόνα 8 Σχηματικό διάγραμμα της ρύθμισης των δύο πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων mTORC1 και mTORC2**

Η κινάση mTOR αποτελεί πυρήνα των δύο αυτών ενδοκυττάρων σηματοδοτικών συμπλόκων. Στο mTORC1 επιδρούν αυξητικοί παράγοντες και θρεπτικά συστατικά όπως είναι τα αμινοξέα, η γλυκόζη και το οξυγόνο. Η ενεργοποίηση του mTORC1 ξεκινά με την ενεργοποίηση της PI3K και τη φωσφορυλίωση της AKT στη θέση Thr 398. Η ενεργοποιημένη AKT φωσφορυλιώνει και αναστέλλει το σύμπλοκο TSC το οποίο είναι αρνητικός ρυθμιστής του mTORC1. Η AMPK, που ενεργοποιείται από κάθε μορφής ενδοκυττάρου stress που μειώνει τα επίπεδα ATP και αυξάνει το λόγο AMP/ATP, καταστέλλει τη δραστηριότητα του mTORC1 μέσω φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης του TSC. Η AKT φωσφορυλιώνεται από το mTORC2 στη θέση Ser473. Οι ρυθμιστές του mTORC2 δεν είναι διασαφηνισμένοι, φαίνεται όμως ότι δέχεται την επίδραση των αυξητικών παραγόντων. Όταν ενεργοποιημένο το mTORC1 προκαλεί τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών p70S6K και 4EBP με απώτερο στόχο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.



- **Αυξητικοί Παράγοντες**

Αυξητικοί παράγοντες, όπως ο EGF1 (epidermal growth factor 1) προκαλούν ενεργοποίηση της PI3K τάξης IA, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τη συνδεδεμένη με την πλασματική μεμβράνη PIP2 προς PIP3. Η φωσφατάση PTEN (phosphate and tensin homolog on chromosome 10) μπορεί να αναστείλει τη δράση της PI3K με το να αποφωσφορυλιώνει την PIP3 προς PIP2.[169] Η PIP3 στη συνέχεια ενεργοποιεί την PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1), η οποία ενεργοποιεί την κινάση AKT (αλλιώς protein kinase B, PKB) φωσφορυλιώνοντας την στη θέση Thr308. Έπειτα, η AKT ενεργοποιεί το mTORC1 μέσω μιας σειράς άρσης αναστολών που εμπλέκουν το σύμπλεγμα της οζώδους σκλήρυνσης (TSC Tuberos Sclerosis Complex) και την PRAS40. Η οζώδης σκλήρυνση (TS, Tuberos Sclerosis) είναι μια πάθηση η οποία κληρονομείται κατά τον αυτόσωμο επικρατούντα χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από την παρουσία αμαρτωμάτων σε μια πληθώρα ιστών του ανθρώπου. Για την πρόκληση της παθήσεως, υπεύθυνες είναι μεταλλάξεις στα γονίδια TSC 1 και TSC 2. Οι πρωτείνες TSC 1 και 2 σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο και προκαλούν αναστολή της δράσης του mTOR.[170] Η TSC 1 (hamartin) ασκεί σταθεροποιητική δράση στο σύμπλοκο.[151] Η TSC 2 (tuberin) διαθέτει στο καρβοξυτελικό άκρο της μια περιοχή που ενεργοποιεί GTPase (GAP- GTPase activating protein) και κατ' αυτόν τον τρόπο ενεργοποιεί την ενδογενή δραστηριότητα GTPase που διαθέτει η πρωτεΐνη Rheb. Η Rheb (Ras homolog enriched in the brain) που ανήκει στην υπερούκογένεια των πρωτεϊνών RAS είναι ισχυρός θετικός ρυθμιστής της λειτουργίας του mTORC1 και εναλλάσσεται διαρκώς μεταξύ μιας ενεργού μορφής προσδεδεμένης με GTP (Rheb-GTP ) και μιας ανενεργού μορφής προσδεδεμένης με GDP (Rheb- GDP). Η TSC 2 προκαλεί τη μετατροπή της Rheb- GTP σε Rheb- GDP και επομένως την απενεργοποιεί.[171] Η AKT προκαλεί άμεσα φωσφορυλίωση στην TSC2 και με αυτόν τον τρόπο προκύπτει διάσπαση του συμπλόκου TSC και μετακίνηση της TSC2 από τη μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα.[172] Η TSC2 απενεργοποιείται, οδηγώντας σε ενεργοποίηση του mTOR.[171] Επιπλέον, ως συνέπεια της φωσφορυλίωσης της TSC2, αποδεσμεύεται η Rheb από αυτήν με αποτέλεσμα την άρση της αναστολής στη

Rheb.[172] Συνοψίζοντας, η προκαλούμενη από την AKT φωσφορυλίωση της TSC2, διαταράσσει την ικανότητα της TSC2 να αναστέλλει τη Rheb και το mTORC1.[173] Επίσης, η ενεργοποιημένη AKT προκαλεί φωσφορυλίωση στην PRAS40 και την αποδεσμεύει από το mTORC1, αίροντας την αναστολή της PRAS40 πάνω στο mTORC1. Η AKT έχει, επίσης, τη δυνατότητα να ενεργοποιεί το mTORC1, χωρίς την παρεμβολή του TSC, φωσφορυλιώνοντας την mTOR απευθείας, στη θέση Ser 2448.[174] Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι είναι δυνατόν να τροποποιείται η κατάσταση του mTORC1, από αυξητικούς παράγοντες χωρίς την παρεμβολή σηματοδότησης από την AKT. Συγκεκριμένα, σε κακοήθη κύτταρα, ο EGF ενεργοποιεί την Erk (extracellular signal-regulated kinase) η οποία φωσφορυλιώνει την TSC2 και διασπά το σύμπλεγμα TSC, αναστέλλοντας τη δράση του συμπλόκου και ενεργοποιώντας την mTOR και τη μετέπειτα σηματοδότηση.[175]

Η διέγερση κυττάρων των θηλαστικών από αυξητικούς παράγοντες οδηγεί σε ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης D (PLD) μέσω της μικρής GTPase Cdc42 και κατά συνέπεια σε αύξηση του ενδοκυτταρίου φωσφατιδικού οξέος (PA). Το φωσφατιδικό οξύ προσδέεται στην περιοχή FRB της mTOR με τρόπο ανταγωνιστικό για την πρόσδεση του συμπλόκου ραπαμυκίνης- FKBP 12 στην mTOR και προκαλεί ενεργοποίηση του mTORC1 και της μετέπειτα σηματοδότησης.[176]

Δεν είναι σαφές αν ο μηχανισμός ενεργοποίησης του mTORC1 από τους αυξητικούς παράγοντες μέσω του φωσφατιδικού οξέος είναι εξαρτώμενος ή όχι από το κλασικό μονοπάτι. Η δραστηριότητα της φωσφολιπάσης D είναι αυξημένη σε πολλούς τύπους νεοπλασιών στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του μαστού, του παχέως εντέρου, του στομάχου και του νεφρού. Η ανταγωνιστική αυτή πρόσδεση για τη θέση FRB έχει αντίκτυπο στην κλινική πράξη. Σε κύτταρα καρκίνου του μαστού, η αυξημένη δραστηριότητα PLD προκαλεί αντίσταση στη δράση της ραπαμυκίνης, με αποτέλεσμα να απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ραπαμυκίνης ώστε να προκύψει θεραπευτικό αποτέλεσμα.[177]

- **Αμινοξέα [161]**

Τα αμινοξέα εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του mTORC1. Οι πρωτείνες RAG-οικογένεια τεσσάρων μικρών κυτταροπλασματικών GTPases- αλληλεπιδρούν με το mTORC1 και είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίησή του από τα αμινοξέα. Η παρουσία αμινοξέων έχει ως συνέπεια την πρόσδεση των RAG πρωτεϊνών στη Raptor και την μετακίνηση του mTORC1 από διάφορες θέσεις στο κυτταρόπλασμα στην περιπυρηνική περιοχή όπου εντοπίζεται η Rheb (θετικός ρυθμιστής του mTORC1). Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι τα αμινοξέα προκαλούν ενεργοποίηση του mTORC1 μέσω του μονοπατιού PI3K και τάξης III PI3K.[178]

- **Ενέργεια[162]**

Το mTORC1 ανταποκρίνεται σε ερεθίσματα που αφορούν τις αποθήκες ενέργειας του κυττάρου. Η AMPK (AMP activated protein kinase) που είναι μια κινάση σερίνης-θρεονίνης και αποτελεί εξελικτικά συντηρημένο αισθητήρα ενέργειας του κυττάρου, αναστέλλει τη δράση του mTORC1 και διασφαλίζει ότι σε συνθήκες έλλειψης ενέργειας δεν προχωρούν οι διαδικασίες πολλαπλασιασμού και κυτταρικής αύξησης. Αυτό συμβαίνει με δύο τρόπους. Πρώτον, σε συνθήκες έλλειψης ενέργειας ( $\uparrow$  AMP/ATP), η LKB1 φωσφορυλιώνει την AMPK. Η ενεργοποιημένη πλέον AMPK φωσφορυλιώνει την TSC2 στις θέσεις T1227 και S1345 καθιστώντας την ενεργό και επομένως σε θέση να αναστέλλει τη λειτουργία του mTORC1.

Δεύτερον, η AMPK προκαλεί απευθείας φωσφορυλίωση στη raptor σε δύο καλά συντηρημένες θέσεις σερίνης, Ser722 και Ser792, η οποία φωσφορυλίωση έχει ως συνέπεια να προσδένονται στη raptor οι πρωτείνες 14-3-3. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η raptor δεν μπορεί να συμμετέχει ούτε στη διαμόρφωση του mTORC1 αλλά ούτε και στην αλληλεπίδραση του mTORC1 με τα διάφορα υποστρώματα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αναστολή του mTORC1 και η διακοπή του κυτταρικού κύκλου ως συνέπεια του ενεργειακού stress.[179, 180]

Έχει παρατηρηθεί ότι σε συνθήκες αύξησης της ελεύθερης ενέργειας υπό την μορφή αύξησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ATP, η AKT αναστέλλει τη

διαμεσολαβούμενη από την AMPK φωσφορυλίωση της TSC2 στις θέσεις T1227 και S1345 και κατ' αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η TSC2, στο ενδοκυττάριο περιβάλλον και επομένως ενεργοποιείται το mTORC1.[181]

- **Υποξία**

Οι συνθήκες υποξίας προκαλούν αναστολή του mTORC1 με δύο σηματοδοτικούς μηχανισμούς: ο ένας εξαρτάται από την AMPK και ο άλλος όχι. Πρώτον, σε καλλιέργειες πλακωδών κυττάρων καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου διαπιστώθηκε ότι η ενεργοποίηση της AMPK λόγω ενεργειακού stress (χαμηλά επίπεδα ATP) συνεπεία της υποξίας, οδήγησε σε εκσεσημασμένη αύξηση της πρωτεΐνης REDD1 (regulated in development and DNA damage 1) η οποία είναι αρνητικός ρυθμιστής του mTORC1.[182]

Δεύτερον, σε κυτταροκαλλιέργειες, η υποξία οδήγησε σε αύξηση της σύνθεσης της REDD1 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, ανεξάρτητα από την AMPK. Εν συνεχεία, παρατηρήθηκε ότι η REDD1 κατέστειλε το mTORC1 μέσω ενεργοποίησης του TSC2.[183]

#### **4.6.Σηματοδοτικοί στόχοι του mTORC1 [152]**

Το mTORC1 είναι βασικός ρυθμιστής της κυτταρικής αύξησης και του πολλαπλασιασμού. Σε ό,τι αφορά τον κυτταρικό κύκλο, προάγει την πρόοδο από την φάση G0/G1.[184] Τα κύρια υποστρώματα της δράσης του mTORC1 είναι οι ριβοσωμικές S6 Κινάσες 1 και 2 (S6K1 και S6K2 ) και οι πρωτεΐνες 4E-BPs (eIF-4E binding proteins), τα οποία συνδέονται με το mRNA και εμπλέκονται στη διαδικασία έναρξης της μετάφρασης (translation) του mRNA και επιμήκυνσης (elongation). Οι πρωτεΐνες 4E-BP είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των 4E-BP1, 4E-BP2 και 4E-BP3 που καταστέλλουν τη μετάφραση. Προσδέονται και ρυθμίζουν τη λειτουργία του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF -4E (eukaryotic translation initiation factor). Η 4E-BP1 όταν δεν είναι φωσφορυλιωμένη προσδέεται στον eIF -4E

και αναστέλλει τη λειτουργία του. Η ενεργοποίηση του mTORC1 οδηγεί σε φωσφορυλίωση της 4E-BP1 και αποσύνδεσή της από τον eIF -4E, ο οποίος αντιδρά με τον eIF -4G. Ο eIF -4G λειτουργεί ως πρωτεΐνη που συγκεντρώνει και άλλους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης, όπως eIF -4A και προσελκύει την υπομονάδα 40S του ριβοσώματος στο άκρο 5' του mRNA και ευοδώνει την έναρξη της μετάφρασης.[185]

Οι ριβοσωμικές S6K1 και S6K2 όταν φωσφορυλιώνονται από το mTORC1, φωσφορυλιώνουν με τη σειρά τους μια σειρά από πρωτεΐνες, όπως ο eEF-2K (eukaryotic elongation factor -2 kinase) και προάγουν τη μετάφραση.

Επιπλέον η σύνθεση των ριβοσωμικών πρωτεϊνών και ριβοσωμικών RNAs ρυθμίζονται θετικά από το mTORC1.[186] Τέλος, το mTORC1 έχει βρεθεί να εμπλέκεται στη σύνθεση των λιπιδίων, απαραίτητων για την κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό.[161]

#### **4.7.mTORC2 (Εικ 7,8)**

Το mTORC2 αποτελείται από επτά διαφορετικές πρωτεΐνες: mTOR, Rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR), mSIN1 (mammalian stress- activated protein kinase interacting protein), Protor-1 (protein observed with Rictor-1), mLST8, Deptor και Tti1/Tel2. Οι Rictor και mSIN1 αλληλεπιδρούν και αλληλοσταθεροποιούνται. Επίσης δεν είναι γνωστή η λειτουργικότητα της αλληλεπίδρασης των Rictor και Protor-1. Η mLST8 είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του συμπλόκου ενώ η Deptor είναι αρνητικός ρυθμιστής του mTORC2.[161] Οι πρωτεΐνες Tti1 και Tel2, είναι σημαντικές για την σταθερότητα και τη διατήρηση της λειτουργικότητας του mTORC2.[166] Το mTORC2 θεωρείτο ότι δεν αντιδρά με το σύμπλοκο FKBP 12- ραπαμυκίνη και επομένως δεν είναι ευάλωτο στην ανασταλτική δράση της ραπαμυκίνης.[187]

Νεότερες μελέτες έρχονται σε αντίθεση με τα παραπάνω δεδομένα. Συγκεκριμένα σε διαφόρων τύπων κυτταροκαλλιέργειες διαπιστώθηκε πως η παρατεταμένη χορήγηση ραπαμυκίνης ανέστειλλε τη συγκρότηση του συμπλόκου.[188] Επίσης, πρόσφατα σε μια μελέτη παρατηρήθηκε ότι η χρόνια χορήγηση ραπαμυκίνης οδηγεί σε διάσπαση του

mTORC2. Στους ιστούς υπό μελέτη παρατηρήθηκε πως η φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων του mTORC2, PKCα S657 και AKT S473, όπως επίσης και SGK (serum glucocorticoid-induced protein kinase) ήταν αμελητέα.[189] Σε συμφωνία με τις δύο προαναφερθείσες μελέτες, σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων διαπιστώθηκε ότι η παρατεταμένη χορήγηση ραπαμυκίνης, είχε ως συνέπεια (εκτός από τη μείωση των επιπέδων mTOR όπως επίσης και αυτών της φωσφορυλίωσης της στις θέσεις Ser 2448 και 2481) την μείωση στην έκφραση του rictor και το σχηματισμό του mTORC2 με συνέπεια τη μείωση της φωσφορυλίωσης της AKT στη θέση S473 (υπόστρωμα του mTORC2). Ένα ακόμα εύρημα ήταν ότι η χορήγηση ραπαμυκίνης μείωσε την έκφραση της νεφρίνης αλλά και της NcK πρωτεΐνης με την οποία αλληλεπιδρά η νεφρίνη με στόχο τη ρύθμιση της ακτίνης του κυτταροσκελετού.[16]

#### **4.8.Ρυθμιστές της δράσης του mTORC2**

Εν αντιθέσει με το mTORC1, σε ό,τι αφορά τη ρύθμιση της δράσης του mTORC2 τα δεδομένα είναι περιορισμένα. Γενικά, θεωρείται ότι οι αυξητικοί παράγοντες άμεσα επηρεάζουν τη λειτουργία του mTORC2 με μηχανισμούς που δεν είναι διασαφηνισμένοι αλλά φαίνεται ότι εμπλέκουν την PI3K.[186]

Πρόσφατα δεδομένα, από καλλιέργειες κυττάρων κακοήθους νεοπλασίας και φυσιολογικών κυττάρων, εμφανίζουν ένα νέο ρόλο για τα ριβοσώματα- όχι όμως την πρωτεϊνοσύνθεση- στην ενεργοποίηση του mTORC2, με το τελευταίο να προσδένεται στα ριβοσώματα με τρόπο εξαρτώμενο από την PI3K.[190]

Επιπλέον, σε μια σχετικά πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκε ότι το σύμπλοκο της οζώδους σκλήρυνσης αποτελεί θετικό ρυθμιστή για το mTORC2, με τρόπο ανεξάρτητο από την Rheb, σε αντίθεση με την ανασταλατική και εξαρτώμενη από την Rheb δράση που ασκεί στο mTORC1.[191]

#### **4.9.Σηματοδοτικοί στόχοι του mTORC2**

Σε ό,τι αφορά τη βιολογία και τους σηματοδοτικούς μηχανισμούς του mTORC2 λίγα είναι γνωστά. Έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην οργάνωση της ακτίνης του

κυτταροσκελετού και της πολικότητας των κυττάρων. Το mTORC2 προκαλεί φωσφορυλίωση της κινάσης PKCa και ελέγχει κατ' αυτόν τον τρόπο την ακτίνη του κυτταροσκελετού.[187] Επιπλέον σε σχέση με τη ρύθμιση της ακτίνης του κυτταροσκελετού από το mTORC2 έχουν διαπιστωθεί τα εξής: Η paxillin είναι μια πρωτεΐνη η οποία όταν φωσφορυλιώνεται εντοπίζεται και συγκεντρώνει και άλλα σηματοδοτικά μόρια απαραίτητα για τη συνάφεια μεταξύ κυττάρων. Η γενετική απαλειφή του mTORC2 απέτρεψε τη φωσφορυλίωση της paxillin και κατά συνέπεια τις σχέσεις συνάφειας μεταξύ κυττάρων. Επιπλέον, απέτρεψε τον πολυμερισμό της ακτίνης. Το mTORC2 ασκεί σηματοδοτικό ρόλο στην ακτίνη του κυτταροσκελετού μέσω των Rho GTPases όπως η Rac1.[192]

Το mTORC2 εμπλέκεται σε διαδικασίες επιβίωσης του κυττάρου μέσω της AKT μιας κινάσης εξαιρετικά σημαντικής για την επιβίωση του κυττάρου – η έλλειψη της θεωρείται καταστροφική για το κύτταρο. Συγκεκριμένα, το mTORC2 φωσφορυλιώνει την AKT στη θέση Ser 473 (υδρόφοβη θέση -hydrophobic motif). Οι δύο φωσφορυλίωσεις της AKT, στη θέση Thr308 από την PDK1 και στη θέση Ser 473 από το mTORC2 (θεωρείται η PDK2), την καθιστούν πλήρως ενεργή.[160] Έχει βρεθεί ότι απώλεια του Rictor σε κύτταρα ανθρώπινα αλλά και μύων οδηγεί σε απώλεια της φωσφορυλίωσης της AKT στη θέση Ser 473, και αυτό παρατηρήθηκε να επηρεάζει συγκεκριμένα υποστρώματα της AKT. Ως συνέπεια της έλλειψης του mTORC2, κατεστάλη η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου.[186] Αντίθετα, άλλοι σηματοδοτικοί στόχοι της AKT έμειναν ανεπηρέαστοι όπως είναι η TSC2 και GSK3-β.[193, 194]

Επιπροσθέτως, το mTORC2 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την SGK1 (serum glucocorticoid- induced protein kinase 1). Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι η φωσφορυλίωση της SGK1 στην υδρόφοβη θέση (hydrophobic motif) δεν μπορεί να συμβεί σε ινοβλάστες knockout για τις υπομονάδες του mTORC2, rictor ή Sin1 ή mLST8.[195] Επιπλέον, στην *Caenorhabditis elegans* διαπιστώθηκε ότι η SGK1

διαμεσολαβεί δράσεις του mTORC2 όπως είναι η ρύθμιση της συσσώρευσης λίπους, του μεγέθους και της αύξησης.[196]

#### **4.10.mTOR σηματοδότηση και καρκίνος**

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν τη σημασία του μονοπατιού mTOR στην παθογένεση του καρκίνου. Η αυξημένη δραστηριότητα του mTORC1 έχει βρεθεί να είναι υποκείμενη αιτία σε σύνδρομα καρκίνων που κληρονομούνται με αυτόσωμο επικρατούντα χαρακτήρα συμπεριλαμβανομένων, (1) του συμπλόκου της οζώδους σκλήρυνσης (tuberous sclerosis complex- TSC), (2) του συνδρόμου Peutz-Jeghers και (3) της νευροϊνωμάτωσης. Οι παραπάνω παθήσεις προκαλούνται από μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια τα οποία είναι αρνητικοί ρυθμιστές της mTOR. Σε ασθενείς με TSC, μετάλλαξη είτε του TSC1 είτε του TSC2 γονιδίου οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας του mTORC1. Η πάθηση αυτή χαρακτηρίζεται από αμαρτώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος, του νεφρού, της καρδιάς, των πνευμόνων και του δέρματος με κάποια από αυτά να εξελίσσονται σε νεοπλασίες.[197] Σε ασθενείς με σύνδρομο Peutz-Jeghers το οποίο χαρακτηρίζεται από πολλαπλούς αμαρτωματώδεις πολύποδες του γαστρεντερικού, η μετάλλαξη της LKB1 διεγείρει τη δραστηριότητα του mTORC1 μέσω του μονοπατιού AMPK-TSC.[198]

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο NF1 και οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργικότητάς του (loss of function) εμπλέκονται στη συγγενή νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (neurofibromatosis type I -NF1). Η νευροϊνωμάτωση τύπου 1 χαρακτηρίζεται από καλοήθη νευροϊνώματα και κακοήθεις όγκους του ελύτρου των περιφερικών νεύρων, αμαρτωματώδεις βλάβες της ίριδος, κακοήθεια της μυελώδους σειράς, γλοιώματα και φαιοχρωμοκύττωμα. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο NF1 έχει δράση πρωτεΐνης που ενεργοποιεί Ras-GTPase (Ras-GTPase activating protein- RasGAP). Ως συνέπεια της απενεργοποίησης του NF1, η αύξηση στη σηματοδότηση από το Ras στην PI3K οδηγεί σε ενεργοποίηση του Akt-mTOR μονοπατιού.[199]



Το φαιοχρωμοκύττωμα παρουσιάζεται στο 1% των ασθενών με νευροϊνωμάτωση τύπου 1.[200] Σε μία ανασκόπηση 148 ασθενών με νευροϊνωμάτωση τύπου 1 και φαιοχρωμοκύττωμα, η μέση ηλικία κατά τη διάγνωση του φαιοχρωμοκυττώματος ήταν τα 42 έτη, όπως και στο γενικό πληθυσμό. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι οι 17 εξ αυτών (11,5%- αναλογία που ισχύει και για το γενικό πληθυσμό) έπασχαν από κακόηθες φαιοχρωμοκύττωμα.[201] Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR διερευνήθηκε σε καλοήθη και κακοήθη φαιοχρωμοκυττώματα και παραγαγγλιώματα με μεταλλάξεις στα γονίδια RET, NF1, και TMEM127. Διαπιστώθηκε πως υπήρχε ενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR όπως αυτό εκτιμήθηκε από την έκφραση του σηματοδοτικού στόχου του mTOR, p70S6 κινάση.[202] Σε αντίθεση με αυτά τα δεδομένα, έρχονται τα αποτελέσματα μίας άλλης μελέτης όπου εξετάστηκαν βιοψίες ασθενών με φαιοχρωμοκύττωμα. Παρατηρήθηκε, με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, χαμηλή έκφραση mTOR τόσο σε περιπτώσεις σποραδικής εμφάνισης του φαιοχρωμοκυττώματος, όσο και σε περιπτώσεις που σχετίζονταν με κληρονομικές παθήσεις. Επιπλέον, η mTOR δεν ήταν αυξημένη σε περιπτώσεις κακοήθους φαιοχρωμοκυττώματος.[203] Είναι αξιοσημείωτο, πως η χορήγηση του αναστολέα του mTORC1, everolimus, σε τέσσερις ασθενείς με κακόηθες φαιοχρωμοκύττωμα δεν είχε ευεργετικά αποτελέσματα, αντίθετα οι ασθενείς παρουσίασαν πρόοδο νόσου.[204] Η PTEN είναι μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη και αρνητικός ρυθμιστής του AKT-mTOR μονοπατιού. Όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι μια φωσφατάση που αποφωσφορυλιώνει την PIP3 σε PIP2. Απώλεια της δραστηριότητας της PTEN έχει ως συνέπεια τη συσσώρευση της PIP3 και περαιτέρω mTOR σηματοδότηση. Μεταλλάξεις και απενεργοποίηση της PTEN και στα δύο αλληλόμορφα παρατηρούνται σε υψηλής κακοήθειας γλοιοβλάστωμα, μελάνωμα, καρκίνο του προστάτη και του ενδομητρίου.[205]

#### **4.11 Akt-mTOR στη Διαβητική Νεφροπάθεια**

Η διαβητική νεφροπάθεια χαρακτηρίζεται στα πρώτα στάδια της από αύξηση του μεγέθους του νεφρού, το οποίο οφείλεται σε υπερτροφία των ήδη υπαρχόντων πειραματικών κυττάρων και σωληναριακών κυττάρων. Η κινάση mTOR δεν εμπλέκεται μόνο στην υπερτροφία των κυττάρων αλλά και στην αύξηση της σύνθεσης της εξωκυταρίου θεμελίου ουσίας που συνεισφέρει στην πάχυνση της βασικής μεμβράνης και στην αύξηση της έκτασης του μεσαγγείου, όπως επίσης και στην φλεγμονή και ίνωση των σωληναρίων και του διάμεσου χώρου.[167] Αφού η νεφροπάθεια συμβαίνει και σε τύπου 1 και τύπου 2 διαβήτη, η υπεργλυκαιμία αποτελεί βασικό στοιχείο στην ενεργοποίηση του mTOR.[206] Η AMPK είναι αισθητήρας των ενδοκυτταρίων επιπέδων ενέργειας και ισχυρός αναστολέας του mTORC1. Είναι μια ετεροτριμερής πρωτεΐνη και αποτελείται από συνδυασμό των  $\alpha$ 1/2-,  $\beta$ 1/2- και  $\gamma$ 1/2/3- υπομονάδων με την  $\alpha$ 1- υπομονάδα. Η ενζυματική της δραστηριότητα εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση στη θέση Thr172 της  $\alpha$ - υπομονάδας. Το καρβοξυτελικό άκρο της  $\beta$ - υπομονάδας προσδένεται στις  $\alpha$ - και  $\gamma$ - υπομονάδες. Η  $\gamma$ - υπομονάδα διαθέτει την περιοχή όπου μπορεί να συνδεθεί το AMP. Αυξημένα επίπεδα AMP διεγείρουν τη δραστηριότητα της AMPK η οποία με τη σειρά της, αναστέλοντας τη δράση του mTORC1, διακόπτει ενεργοβόρες αντιδράσεις, όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, ενώ αυξημένα επίπεδα ATP την καταστέλλουν. Σε νεφρικό φλοιό πειραματοζώων με τύπου 1 (επαγόμενο από τη στρεπτοζοτοκίνη) αλλά και τύπου 2 (db/db ποντίκια) διαβήτη, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση στη φωσφορυλίωση της AMPK (και επομένως μειωμένη δραστηριότητα της AMPK), ταυτόχρονα με νεφρική υπερτροφία. Επομένως, φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στη μειωμένη φωσφορυλίωση της AMPK και της νεφρικής υπερτροφίας στο διαβήτη τύπου 1 και 2. Μάλιστα, ο θετικός ρυθμιστής της AMPK μετοξομίνη αύξησε τη δραστηριότητα της AMPK και κατέστειλε το mTORC1, παράλληλα με αναστολή της νεφρικής υπερτροφίας σε τύπου 1 διαβητικά πειραματόζωα, υπό σταθερές συνθήκες υπεργλυκαιμίας. Επιπροσθέτως, σε καλλιέργειες πειραματικών επιθηλιακών κυττάρων σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, παρατηρήθηκε πάλι ότι η φωσφορυλίωση της AMPK ήταν μειωμένη ενώ το μονοπάτι

PI3K-Akt-mTOR ήταν ενεργοποιημένο. Οι αλλαγές στα επίπεδα AMP και ATP δε φαίνεται να ερμηνεύουν τη μειωμένη δραστηριότητα της AMPK. Αντίθετα διαπιστώθηκε πιθανός ρόλος της AKT στην άνωθεν ρύθμιση της δραστηριότητας της AMPK. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η αυξημένη, λόγω της υπεργλυκαιμίας, AKT αναστέλλει την AMPK. Επομένως, στη σηματοδότηση, η AMPK βρίσκεται ενδιάμεσως της AKT και της mTOR.[207]

Σε ό,τι αφορά τον διαβήτη τύπου 2, η ενεργοποίηση του mTOR συμβαίνει πολύ πιο πριν την εμφάνιση της μόνιμης υπεργλυκαιμίας. Βασικός παράγων είναι η αυξημένη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών που οδηγεί σταθερά σε ενεργοποίηση του mTOR έχοντας ως συνέπεια την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Σε μια σειρά από μελέτες σε πειραματικά μοντέλα διαβητικής νεφροπάθειας διαπιστώθηκε ο ρόλος του AKT – mTOR στη διαμεσολάβηση της νεφρικής βλάβης. Συγκεκριμένα, με τη χρήση της ραπαμυκίνης, αναστολέα mTOR, σε αρουραίους με σακχαρώδη διαβήτη διάρκειας ενός μήνα διαπιστώθηκε ενεργοποίηση του AKT – mTOR σε συνδυασμό με σπειραματική υπερτροφία και αυξημένη φλεγμονώδη αντίδραση στο νεφρό, όπως αυτή υποδεικνύεται από αυξημένη διήθηση από μακροφάγα. Η θεραπεία με ραπαμυκίνη αντέστρεψε τις παρατηρούμενες βλάβες, αναδεικνύοντας το ρόλο των εν λόγω κινασών.[208]

Επίσης, σε πειραματόζωα με διάρκεια διαβήτη τεσσάρων μηνών, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση p-AKT και mTOR, και σπειραματική υπερτροφία. Η χορήγηση χαμηλής δόσης ραπαμυκίνης για τέσσερις εβδομάδες μείωσε την p-AKT και επανέφερε στα φυσιολογικά επίπεδα την mTOR, χωρίς όμως καμία επίδραση στην σπειραματική υπερτροφία και τη διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα. Επιπλέον η θεραπεία με ραπαμυκίνη συσχετιζόταν με μείωση των επιπέδων TGF-β στο νεφρό και CTGF στο σπείραμα καθώς επίσης και με μείωση της συγκέντρωσης της εξωκυττάριας θεμελίου ουσίας στο σπείραμα.[209] Σε δύο επιπλέον μελέτες σε πειραματικά μοντέλα διαβητικής νεφροπάθειας διαπιστώθηκε η συμμετοχή του σηματοδοτικού μονοπατιού AKT – mTOR στη νεφρική υπερτροφία. Στην μεν πρώτη, σε διαβητικά πειραματόζωα παρατηρήθηκε πως η Gas6 (growth arrest- spesific gene) η οποία διαδραματίζει

σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νεφρικής υπερτροφίας στο σακχαρώδη διαβήτη, προκαλεί τη βλάβη μέσω του μονοπατιού AKT – mTOR.[210]

Στη δε δεύτερη, διαπιστώθηκε σε πρώιμη διαβητική νεφροπάθεια, πως υπάρχει αυξημένη φωσφορυλίωση, και επομένως ενεργοποίηση της AKT όπως επίσης και αυξημένη ενεργοποίηση σηματοδοτικών στόχων στην κατωφέρεια της mTOR, παράλληλα με νεφρική υπερτροφία. Τα παραπάνω βιολογικά αποτελέσματα αντεστράφησαν με τη χορήγηση της ραπαμυκίνης.[211]

Η S6K1, σηματοδοτικός στόχος του mTORC1 που εμπλέκεται στην πρωτεϊνοσύνθεση και την κυτταρική αύξηση, έχει βρεθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην νεφρική υπερτροφία στο σακχαρώδη διαβήτη. Αυτό παρατηρήθηκε σε πειραματόζωα knock-out για την S6K1 τα οποία έγιναν διαβητικά και παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο λόγο μάζας νεφρών/ σωματικό βάρος σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες.[212]

Επιπλέον σε db/db ποντίκια παρατηρήθηκε αυξημένη φωσφορυλίωση της S6K, κατώτερος σηματοδοτικός στόχος της mTOR, στην περιοχή του μεσάγγειου, εύρημα που αντεστράφη πλήρως με τη χορήγηση ραπαμυκίνης.[213]

Σε νεφρικό φλοιό ποντικών db/db διαπιστώθηκε ότι η δραστηριότητα της Akt/PKB ήταν αυξημένη 2 φορές σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στο νεφρικό φλοιό των μαρτύρων.[214]

Τέλος, παρόλο που η ραπαμυκίνη στα πειραματικά μοντέλα έχει χρησιμοποιηθεί προκειμένου να αναδείξει το ρόλο του μονοπατιού mTOR στην παθογένεση της διαβητικής νεφροπάθειας, υπάρχουν σοβαροί ενδοιασμοί και ερωτηματικά ως προς την χρήση της σε ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια. Και αυτό, για δύο βασικούς λόγους: Πρώτον, το mTORC1, μέσω της S6K1, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των β- κυττάρων του παγκρέατος. Η χορήγηση της ραπαμυκίνης σε διαβητικά ποντίκια επιδείνωσε την υπεργλυκαιμία μέσω αύξησης της αντίστασης στην ινσουλίνη και μείωσης της λειτουργικότητας και της μάζας των β- παγκρεατικών κυττάρων τουλάχιστον κατά 50%.[215]

Δεύτερον, έχει παρατηρηθεί πως η ραπαμυκίνη προκαλεί πρωτεинуρία επιπέδων νεφρωσικού συνδρόμου. Αυτό διαπιστώθηκε πρώτη φορά σε ασθενείς μετά από μεταμόσχευση νεφρού όπου έγινε αλλαγή της ανοσοκατασταλτικής τους αγωγής από αναστολείς της καλσινευρίνης σε αναστολείς mTOR.[216] Επιπλέον, σοβαρή πρωτεинуρία διαπιστώθηκε σε λήπτες μυελού των οστών και παγκρεατικών νησιδίων στους οποίους χορηγήθηκαν αναστολείς mTOR. Σε διαβητικούς ασθενείς, που μεταμοσχεύθηκαν με παγκρεατικά νησίδια, παρατηρήθηκε πρωτεинуρία κατά τη διάρκεια της θεραπείας με sirolimus. Παρόλο που οι νεφροί τους μπορεί να είχαν ήδη υποστεί βλάβη συνεπεία του σακχαρώδους διαβήτη, εντούτοις η εμπλοκή του sirolimus είναι πολύ πιθανή.[217] Επιπλέον, νεφρωσικό σύνδρομο και εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (focal segmental glomerulosclerosis FSGS) παρατήρηθηκαν σε ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού που έλαβαν de novo sirolimus και οι οποίοι δεν είχαν προηγούμενο ιστορικό FSGS.[218]

## (B) ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Εισαγωγή

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I αποτελεί μία από τις πιο συχνές αυτοάνοσες παθήσεις της παιδικής ηλικίας σε παγκόσμια κλίμακα. Η καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος λόγω γενετικών ή και περιβαλλοντικών παραγόντων έχει ως συνέπεια την ανεπάρκεια της ινσουλίνης για τις ανάγκες του ανθρώπινου οργανισμού.[219] Η υπεργλυκαιμία που προκύπτει, αποτελεί το εναρκτήριο ερέθισμα για την ενεργοποίηση μιας σειράς από παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς με βλαπτική επίδραση σε όργανα στόχους συμπεριλαμβανομένου και του νεφρού. Η διαβητική νεφροπάθεια στα πρώιμα στάδια διαδράμει λανθάνουσα κλινική πορεία με μόνο δομικές αλλοιώσεις όπως είναι η υπερτροφία του νεφρού. Καθώς η πάθηση εξελίσσεται, η απέκκριση της λευκωματίνης στα ούρα αυξάνεται.[90] Το σπείραμα και το ποδοκύτταρο κατέχουν κεντρική θέση στην παθογένεση και εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας.[96] Σε πειραματικά μοντέλα διαβητικής νεφροπάθειας όπως είναι αυτό των Zucker αρουραίων έχει διαπιστωθεί ότι νεφροπάθεια ξεκινά με τη βλάβη των ποδοκυττάρων.[220, 221]

Το σύστημα ρενίνης αγγειοτασίνης διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης στο σακχαρώδη διαβήτη. Είναι χαρακτηριστικό πως το συστηματικό σύστημα ρενίνης αγγειοτασίνης είναι κατεσταλμένο στη διαβητική νεφροπάθεια, ενώ το τοπικό- ενδονεφρικό είναι ενεργό και διαμεσολαβεί κατά αυτόν τον τρόπο τις βλαπτικές επιδράσεις του διαβήτη στο νεφρό. Σε πειραματικά μοντέλα διαβητικής νεφροπάθειας τύπου I έχουν παρατηρηθεί αυξημένα ενδοσπειραματικά επίπεδα αγγειοτασίνης II σε σχέση με αυτά που θα αναμένονταν από τη μέτρηση των κυκλοφορούντων συστατικών του ΣΡΑ.[118, 119] Επιπλέον, σε σπειράματα αρουραίων Zucker έχει διαπιστωθεί αύξηση του αγγειοτασινογόνου και της αγγειοτασίνης II σε σχέση με τους αντίστοιχους υγιείς μάρτυρες. Σε συνάφεια με τα παραπάνω ευρήματα είναι και τα αποτελέσματα από το επαγόμενο με στρεπτοζοτοκίνη μοντέλο σακχαρώδους διαβήτη. Ανιχνεύθηκαν αυξημένα ενδοσπειραματικά επίπεδα αγγειοτασινογόνου και αγγειοτασίνης II στους διαβητικούς επίμυες.[123, 124] Η

αυξημένη παραγωγή αγγειοτασίνης II οφείλεται αφ' ενός σε αυξημένη παραγωγή αγγιοτενσινογόνου τοπικά και αφ' ετέρου σε αυξημένη ενδονεφρική μετατροπή σε αγγειοτασίνη II άλλων πεπτιδίων όπως της αγγειοτασίνης 1-9.[124] Σε νεφρικές βιοψίες ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια, βρέθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας αυξημένη σπειραματική έκφραση μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης II, εύρημα που ερμηνεύει εν μέρει την αυξημένη ενεργότητα του ενδονεφρικού ΣΡΑ στο διαβήτη.[120] Επιπροσθέτως, τα ποδοκύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα AT1 και σε διαβητικό περιβάλλον παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση αγγειοτασινολόγου, αγγειοτασίνης II και AT1.[1, 127]

Η ευεργετική επίδραση των αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου και συγκεκριμένα της καπτοπρίλης στην επιβράδυνση της προόδου νόσου διαπιστώθηκε αρχικά από το Captopril Study Group όπου οι ασθενείς με τύπου I σακχαρώδη διαβήτη παρακολούθησαν για 4 έτη.[222]

Δεδομένα που να συσχετίζουν τη δράση της αγγειοτασίνης II με την κινάση mTOR προέκυψαν από ένα σύστημα κυτταροκαλλιέργειας ανθρώπινων καρδιακών λείων μυϊκών κυττάρων.[223] Η κινάση mTOR είναι μια, εξελικτικά συντηρημένη ανάμεσα στα είδη, κινάση σερίνης-θρεονίνης. Αποτελεί κεντρικό στοιχείο δύο σύνθετων πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, του mTORC1 και mTORC2. Η PI3K δέχεται είσοδο από θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες και οδηγεί στη φωσφορυλίωση της κινάσης AKT στη θέση Thr308. Η κινάση AKT είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων[224] και ούσα ενεργοποιημένη οδηγεί μέσω μιας σειράς άρσης αναστολών που εμπλέκουν το σύστημα της οζώδους σκλήρυνσης (tuberous sclerosis system- TSC), στην ενεργοποίηση του mTORC1 το οποίο είναι υπεύθυνο για τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση των κυττάρων.[167] Το mTORC2, αν και λίγα είναι γνωστά, δέχεται είσοδο από αυξητικούς παράγοντες και οδηγεί στη φωσφορυλίωση της AKT στη θέση Ser473.[160] Η AKT θεωρείται πλήρως ενεργοποιημένη όταν είναι διπλά φωσφορυλιωμένη. Επιπλέον η AKT δύναται να φωσφορυλιώσει την mTOR στη θέση Ser2448 και επομένως να ενεργοποιήσει απευθείας το mTORC1 χωρίς την παρεμβολή του TSC.[174]

Η AMP-activated protein kinase (AMPK) ενεργοποιείται από χαμηλά επίπεδα γλυκόζης και καταστέλλει το mTORC1 και επομένως εξασφαλίζει ότι σε συνθήκες έλλειψης ενέργειας ενεργοβόρες διεργασίες μέσα στο κύτταρο αναστέλλονται.[225]

Σε μια σειρά από μελέτες σε πειραματικά μοντέλα διαβητικής νεφροπάθειας διαπιστώθηκε ότι το μονοπάτι PI3K-AKT-mTOR εμπλέκεται στη παθοφυσιολογία της νεφρικής βλάβης.[167]

Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν δεδομένα σε ό,τι αφορά την επίδραση της λοσαρτάνης στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT-mTOR στη διαβητική νεφροπάθεια τύπου I in vivo. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθούν, σε ένα πειραματικό μοντέλο διαβητικής νεφροπάθειας τύπου I υπό λοσαρτάνη,

a) Τα επίπεδα της ολικής AKT (total AKT - tAKT), της φωσφορυλιωμένης (p) pAKT Thr308, της pAKT Ser473, της mTOR, και της ενεργοποιημένης mTOR φωσφορυλιωμένης στη θέση Ser2448, στο σπείραμα.

b) Τα επίπεδα των παραπάνω υπό μελέτη μορίων στο ποδοκύτταρο πραγματοποιώντας μελέτη συνεντόπισης με τον ειδικό ποδοκυτταρικό δείκτη νεφρίνη.

c) Η επίδραση της λοσαρτάνης στο πάχος της σπειραματικής βασικής μεμβράνης και την έκταση του μεσαγγείου.

Παράλληλα, μελετήθηκαν κλινικά και βιοχημικά δεδομένα των πειραματοζώων, όπως η συστολική αρτηριακή πίεση, η απέκκριση της λευκωματίνης στα ούρα 24ώρου και η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη.

## **2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **2.1 Πειραματόζωα**

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν αρουραίοι Sprague- Dawley ηλικίας 8- 10 εβδομάδων από το Ινστιτούτο Παστέρ (Αθήνα). Τα πειραματόζωα κατέστησαν διαβητικά με την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης (δόση 65mg/kg σωματικού βάρους), σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου 0,1M. Στους αντίστοιχους υγιείς μάρτυρες χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά μόνο το έκδοχο (diluent) δηλαδή το ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου. Τρεις ημέρες μετά τη χορήγηση της



στρεπτοζοτοκίνης, έγινε μέτρηση της γλυκόζης αίματος και τα πειραματόζωα με γλυκόζη αίματος > 350 mg/dl συμπεριλήφθησαν στη μελέτη.

Στα διαβητικά πειραματόζωα χορηγείτο κάθε δεύτερη μέρα ινσουλίνη glargine υποδορίως σε δόση εξατομικευμένη με στόχο γλυκόζη αίματος μεταξύ 350 έως 500 mg/dl.

Τα πειραματόζωα ελάμβαναν καθημερινά τροφή (standard rat feed) και νερό ad libitum και ευρίσκοντο σε ένα δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία και υγρασία και 12ωρο κύκλο φωτός-σκότους. Οι χειρισμοί στα πειραματόζωα διενεργήθηκαν σύμφωνα με τη σχετική νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης και αφού ενεκρίθησαν από την Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

## 2.2 Σχεδιασμός της μελέτης

Μια φορά το μήνα τα πειραματόζωα τοποθετούνταν σε ειδικούς μεταβολικούς κλωβούς με σκοπό την 24ωρη συλλογή ούρων. Τα πειραματόζωα, κατά τη διάρκεια της συλλογής, είχαν πρόσβαση σε πόσιμο νερό και τροφή ad libitum. Τα ούρα που συλλέγονταν προορίζονταν για τη μέτρηση της λευκωματίνης. Πέντε μήνες μετά την έναρξη του σακχαρώδους διαβήτη, τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες: διαβητικά πειραματόζωα (Dm n=6), διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη (LKT Laboratories; St. Paul, MN) σε δόση 50 mg/kg σωματικού βάρους, διαλυμένη στο πόσιμο νερό (DmRx n=6), υγιείς μάρτυρες (Ctrl n=6), υγιείς μάρτυρες υπό λοσαρτάνη σε δόση 50 mg/kg σωματικού βάρους, διαλυμένη στο πόσιμο νερό (CtrlRx n=6). Δύο μήνες μετά την έναρξη της χορήγησης λοσαρτάνης τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε μεταβολικούς κλωβούς με σκοπό την 24ωρη συλλογή ούρων και τη μέτρηση των επιπέδων λευκωματίνης. Η μέτρηση της λευκωματίνης έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) έναντι της λευκωματίνης του επίμυος (Bethyl Laboratories, Inc TX). Επίσης έγινε μέτρηση της αρτηριακής πίεσης των πειραματοζώων αφού είχε προηγηθεί ο απαραίτητος εγκλιματισμός τους στο σύστημα μέτρησης αρτηριακής πίεσης (IITC Life Science Inc; California, CA). Έπειτα, τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με

ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση νατριούχου πεντοβαρβιτάλης σε δόση 50 mg/kg σωματικού βάρους και θανατώθηκαν με αφαίμαξη. Κατά τη διάρκεια της θυσίας έγινε λήψη αίματος προς μέτρηση κρεατινίνης και γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης. Η μέτρηση κρεατινίνης έγινε σε αυτόματο αναλυτή (Olympus, Tokyo, Japan), ενώ η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (High performance liquid chromatography- HPLC), επίσης σε αυτόματο αναλυτή (Bio-Rad D10). Οι νεφροί απομονώθηκαν και αφαιρέθηκε η κάψα τους, ζυγίσθηκαν και μετά τοποθετήθηκαν σε τριβλία Petri με 5 ml ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1x (Phosphate Buffered Saline) σε πάγο.

### **2.3 Απομόνωση σπειραμάτων**

Έγινε απομόνωση σπειραμάτων με τη μέθοδο διαδοχικών ηθμών διαφορετικής διαμέτρου πόρου. Χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα (Retsch, Haan, Germany) με διάμετρο πόρου 150, 106 και 75μm τα οποία τοποθετήθηκαν το ένα πάνω από το άλλο. Ο νεφρικός φλοιός αφού πρώτα πολτοποιήθηκε, διηθήθη αρχικά από το φίλτρο των 150 μm πάνω στο οποίο συγκρατήθηκαν σωληνάκια και αγγεία, ενώ διήλθε το υλικό που περιέχει τα σπειράματα. Εν συνεχεία στο φίλτρο των 106 μm ο ιστός που συγκεντρώθηκε υπέστη εκτεταμένες πλύσεις με φυσιολογικό ορό με αποτέλεσμα να διέλθουν τα σπειράματα τα οποία συγκεντρώθηκαν στο τελευταίο φίλτρο των 75μm. Στο φίλτρο των 106 μm ο ιστός που παρέμεινε ήταν σωλαναριακός. Τέλος στο φίλτρο των 75μm τα σπειράματα που συλλέχθηκαν υπέστησαν πλύσεις με φυσιολογικό ορό ώστε να απορριφθούν μικρά τμήματα σωληναρίων. Το σπειραματικό υλικό που απομονώθηκε εξετάστηκε σε οπτικό μικροσκόπιο και διαπιστώθηκε ότι είχε καθαρότητα >95%.[226]

## 2.4 Μελέτη του πειραματικού υλικού με τη μέθοδο ανοσοστυπώματος κατά Western (Western Blot)

Τα πειράματα, που συλλέχθηκαν, ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα RIPA σύστασης 100mM HEPES, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 10% v/v glycerol, 100mM NaF, 10mM Sodium Pyrophosphate, 0.5% w/v sodium deoxycholate, 1% v/v NP-40 που περιείχε αναστολείς πρωτεασών (Roche Diagnostics; Indianapolis, IN) και φυγοκεντρήθηκαν στα 13,000 × g για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο υλικό που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση συλλέχθηκε και αποθηκεύθηκε σε θερμοκρασία -80C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Τα δείγματα πειραματικού υλικού των πειραματοζώων (ποσότητα 5 µg ολικής πρωτεΐνης ανά δείγμα) θερμάνθηκαν για 10λεπτά στους 70°C σε αναγωγικό διάλυμα φόρτωσης (αποτελούμενο από 50mM Tris-Cl [pH 6.8], 2% w/v SDS, 0.1% w/v bromophenol blue, 10% v/v glycerol, 5% v/v β-mercaptoethanol). Εν συνεχεία, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα 5% BSA (bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich) TBS 1× Tween-20 (0.1%) για 1 ώρα με στόχο την παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης (blocking) και έπειτα επώσθηκαν για 12 ώρες, σε συνεχή ανάδευση, στους 4°C με τα ακόλουθα πρωτογενή αντισώματα: Akt pAb (αραίωση 1:500), Ser473 pAkt mAb (αραίωση 1:500), Thr308 pAkt mAb (αραίωση 1:500) (Cell Signaling Technology; Boston, MA) όλα είχαν παραχθεί σε κουνέλι και αντίσωμα έναντι της νεφρίνης που είχε παραχθεί σε ινδικό χοιρίδιο (guinea pig) (αραίωση 1:500) (Progen GmbH; Heidelberg, Germany). Ακολούθησαν 3 πλύσεις των μεμβρανών, διάρκειας 10 λεπτών η καθεμία, με διάλυμα 0.05% Tween-20 σε TBS. Αντίστοιχα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με horseradish peroxidase (HRP) (Cell Signaling Technology) εφαρμόστηκαν στις μεμβράνες για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε πείραμα διενεργήθηκε εις διπλούν. Το σήμα στα φιλμ αναπτύχθηκε με ένα σύστημα ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (GenScript; Piscataway, NJ). Οι ζώνες που εμφανίσθηκαν στα φιλμ και αντιπροσώπευαν τις υπό μελέτη πρωτεΐνες, μετρήθηκαν με πυκνομετρία με το

πρόγραμμα ImageJ (National Institutes of Health; Bethesda, MD). Η ισότιμη εφαρμογή ολικής πρωτεΐνης ιστικού υλικού στις μεμβράνες εκτιμήθηκε με την χρώση των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης με Ponceau-S (Sigma-Aldrich), προτού εφαρμοσθούν τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα.

## **2.5 Μελέτες φωτοmikροσκοπίας**

Το τεμάχιο του νεφρού που προοριζόταν για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο εμβαπτιζόταν σε ουδέτερη φορμόλη 10% και αποστέλλετο σε νεφροπαθολογοανατόμο για έγκλειση σε παραφίνη και χρώση υπεριοδικού οξέος-Schiff (PAS). Η εκτίμηση της έκτασης του μεσαγγείου έγινε από νεφροπαθολογοανατόμο, ο οποίος δε γνώριζε την ομάδα μελέτης που ήταν το κάθε πειραματόζωο, σε μια κλίμακα από 0= απύσα, 1= ήπια, 2= ενδιάμεσης βαρύτητας, έως 3= σοβαρή.

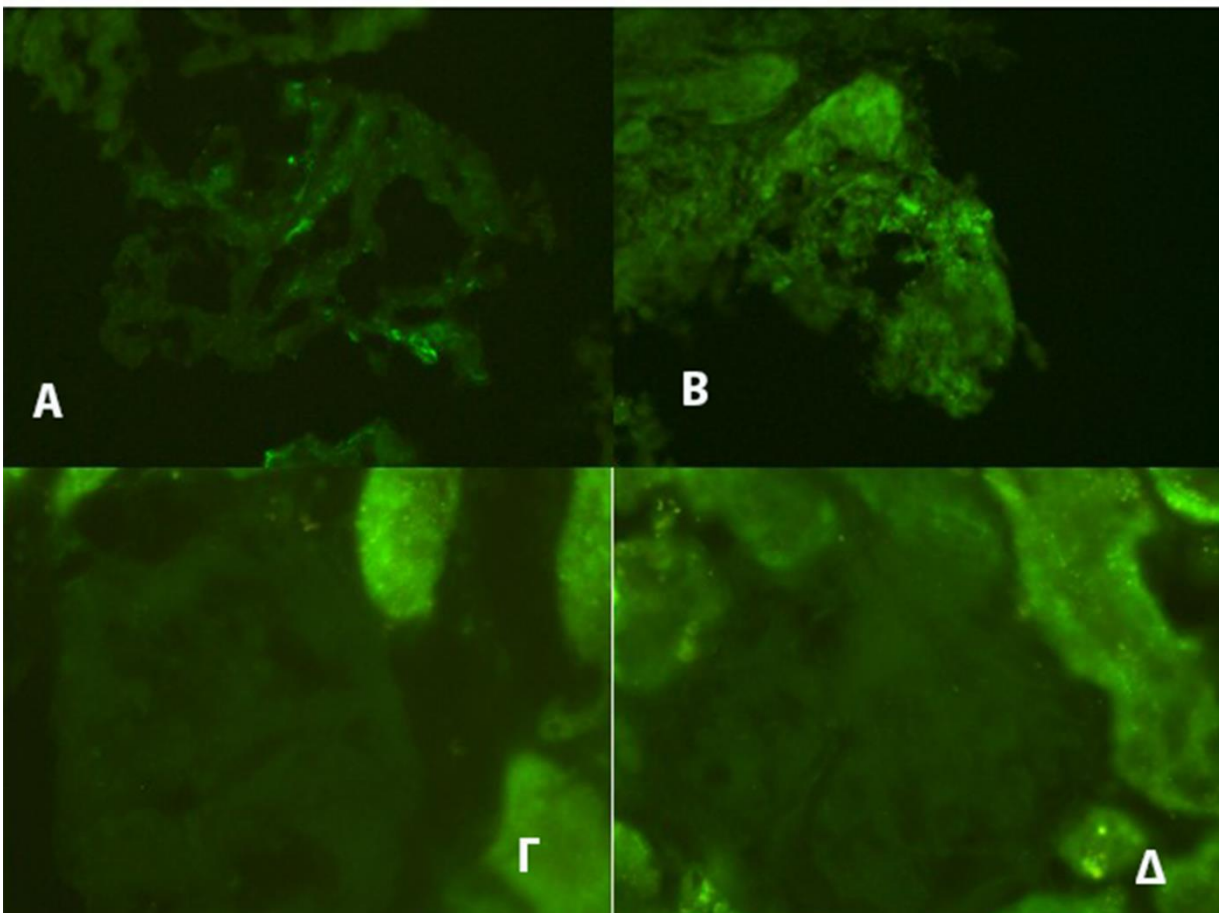
## **2.6 Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας**

Το τεμάχιο του νεφρού που προοριζόταν για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εμβαπτιζόταν σε διάλυμα γλουταραλδεϋδης 5% v/v σε 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων και αποστέλλονταν στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για περαιτέρω επεξεργασία. Η διαδικασία της επεξεργασίας περιλαμβάνει την περαιτέρω μονιμοποίηση σε 1% τετροξείδιο του Οσμίου για 1 ώρα, αφυδάτωση του ιστού σε διαδοχικές αραιώσεις αιθανόλης και έγκλειση σε ρητίνη Epon 812. Στη συνέχεια με τη χρήση μικροτόμου κόβονταν πολύ λεπτές τομές (40-50nm) οι οποίες τοποθετούνταν σε δίσκους πλέγματος χρυσού και βάφονταν με οξεικό ουράνιο και κιτρικό μόλυβδο. Η εξέταση των τομών γινόταν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο JEM 100 CX-II; JEOL, Tokyo Japan. Τουλάχιστον 10 σπειράματα εξετάστηκαν ανά ζώο. Οι μικροφωτογραφίες ελήφθησαν με ψηφιακή κάμερα ES1000W Erlangshen και αναλύθηκαν με το λογισμικό Digital-Micrograph software (Gatan GmbH, Munchen, Germany). Με τη χρήση του λογισμικού αυτού έγινε μέτρηση του πάχους της βασικής μεμβράνης (BM) όλων των ανοικτών αγκυλών τριχοειδών των σπειραμάτων.

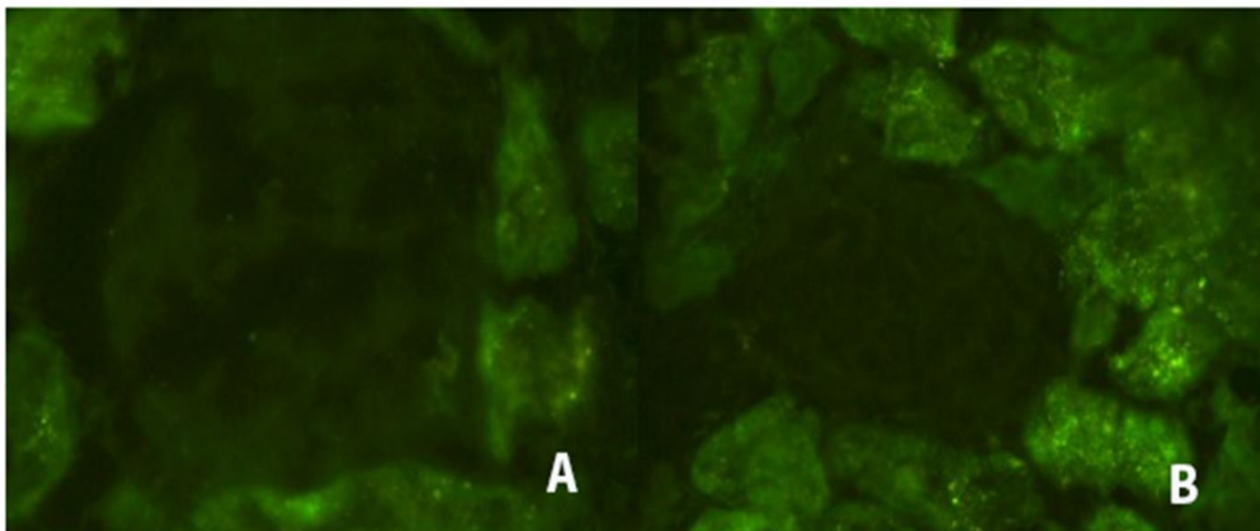
## 2.7 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Ο νεφρικός ιστός αμέσως μετά την απομόνωσή του, διατέμενο και εμβαπτίζοταν σε OCT Compound (SAKURA; Osaka, Japan) πάνω σε ταινίες προσροφητικού χαρτιού Watmann, καταψύχεται ταχέως σε υγρό άζωτο και φυλασσόταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Για τον ανοσοφθορισμό τομές πάχους 5- $\mu\text{m}$  κόβονταν σε κρυοτόμο και τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Εν συνεχεία οι τομές μονιμοποιούνταν με παραφορμαλδεΐδη 4% για 13 λεπτά και μετά ακολουθούσαν τρεις πλύσεις με PBS Tween-20 (0.05%), διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία, έπειτα μία πλύση με Triton X100 (0.1%) για 10 λεπτά και τέλος τρεις πλύσεις με PBS Tween-20 (0.05%), διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία. Η παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης (blocking), έγινε με ορό κατσίκας (Life Technologies; Carlsbad, CA), για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, επάνω στις τομές εφαρμόστηκαν, για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, AffiniPure τμήματα Fab IgG που είχαν παραχθεί σε κατσίκα έναντι αρουραίου (AffiniPure Fab fragment goat anti-rat IgG - Jackson ImmunoResearch; Suffolk, UK) σε συγκέντρωση 0.2 mg/ml. Οι τομές επώαστηκαν για 18 ώρες σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$  με τα ακόλουθα πρωτογενή αντισώματα έναντι αντιγόνων αρουραίου: Akt pAb (αραίωση 1:100), Ser473 pAkt mAb (αραίωση 1:100), Thr308 pAkt mAb (αραίωση 1:800), mTOR mAb (αραίωση 1:150), Ser2448 phospho-mTOR mAb (αραίωση 1:100) (όλα είχαν παραχθεί σε κουνέλι από Cell Signaling Technology; Boston, MA) και νεφρίνη που είχε παραχθεί σε ινδικό χοιρίδιο (αραίωση 1:200) (Progen GmbH). Τα δευτερογενή αντισώματα, που είχαν παραχθεί σε κατσίκα έναντι ινδικού χοιριδίου Dylight 649 (αραίωση 1:350; Jackson ImmunoResearch) και σε κατσίκα έναντι κουνελιού Alexa Fluor 488 (αραίωση 1:800; Invitrogen, Carlsbad, CA), εφαρμόστηκαν στις τομές για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλύφθηκαν με το υλικό mowiol 4-88 (Calbiochem) και καλυπτρίδα. Η παρατήρηση των τομών πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica (Leica GmbH; Wetzlar, Germany) χρησιμοποιώντας τον αντικειμενικό φακό 40 $\times$ . Το κάθε πείραμα συνεντόπισης πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Ανά πειραματόζωο, εξετάστηκαν 50 σπειράματα τουλάχιστον.

Η ύπαρξη ενδογενών ανοσοσφαιρινών IgG στα σπειράματα των πειραματοζώων ελέγχθηκε με επώαση των τομών με Dylight 488 IgG (H+L; Jackson ImmunoResearch), που είχε παραχθεί σε κατσίκια έναντι αρουραίου, σε αραιώση 1:100 για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στα σπειράματα των διαβητικών πειραματοζώων, η γραμμική εναπόθεση ήταν εμφανής (Εικ 1), κάτι που υπεδείκνυε ενδογενή εναπόθεση IgG. Το μη ειδικό σήμα που οφείλεται στην εναπόθεση IgG, εξαλείφθηκε με την εφαρμογή πάνω στις τομές, AffiniPure τμήματα Fab IgG (AffiniPure Fab fragment goat anti-rat IgG - Jackson ImmunoResearch; Suffolk, UK), που είχε παραχθεί σε κατσίκια έναντι αρουραίου, στη συγκέντρωση και στις συνθήκες που προαναφέρθησαν (Εικ 2). Το πρόγραμμα ImageJ (National Institutes of Health; Bethesda, MD) χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της έντασης της φθορισμού της νεφρίνης, της tAKT, της Ser473 pAKT, της Thr308 pAKT, της mTOR, και της Ser2448 phospho-mTOR.



**Εικόνα 1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός ×40.** (Α) Διαβητικό πειραματόζωο υπό λοσαρτάνη, (Β) Διαβητικό πειραματόζωο, (Γ) Υγιές πειραματόζωο, (Δ) Υγιές πειραματόζωο υπό λοσαρτάνη. Είναι εμφανής η ενδογενής εναπόθεση ανοσοσφαιρινών στα σπειράματα των διαβητικών πειραματοζώων (Α και Β) σε σχέση με τα αυτά των υγιών πειραματοζώων (Γ και Δ).



**Εικόνα 2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός  $\times 40$ .** (A) Διαβητικό πειραματόζωο υπό λοσαρτάνη, (B) Διαβητικό πειραματόζωο. Είναι εμφανής η εξάλειψη του μη ειδικού σήματος που οφείλεται στην ενδογενή εναπόθεση ανοσοσφαιρινών στα σπειράματα στο σακχαρώδη διαβήτη.

## 2.8 Ανάλυση συνεντόπισης

Το λογισμικό Cell Profiler (Cell Profiler Software; Cambridge, MA) και ο συντελεστής Pearson's χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του βαθμού της συνεντόπισης tAKT και νεφρίνης, Ser473 pAKT (pAKT473) και νεφρίνης, Thr308 pAKT (pAKT308) και νεφρίνης, mTOR και νεφρίνης, and Ser2448 phospho-mTOR (pTOR2448) και νεφρίνης.[227]

## 2.9 Στατιστική ανάλυση

Το λογισμικό SPSS έκδοση 19 και 21 (SPSS, Inc., IBM Company, Chicago, IL) χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία και την ανάλυση των δεδομένων. Η κατανομή των δεδομένων εκτιμήθηκε και σε περίπτωση κανονικής κατανομής των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) με διόρθωση κατά Bonferroni εκτός και αν σημειώνεται διαφορετικά. Σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής των δεδομένων διενεργήθηκε λογαριθμικός μετασχηματισμός. Αν μετά το λογαριθμικό μετασχηματισμό, η κατανομή των δεδομένων δεν ήταν κανονική, εφαρμόστηκε το στατιστικό κριτήριο ελέγχου Kruskal-Wallis για ανεξάρτητα δείγματα. Το τεστ Mann-

Whitney U χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα σε δύο διαφορετικές ομάδες. Η ανάλυση της διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (repeated measures ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν οι μηνιαίες μετρήσεις λευκωματίνης ούρων 24h. Για σύγκριση ποιοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το ακριβές κριτήριο του Fisher (Fisher's exact test). Το όριο των πιθανοτήτων κάτω από το οποίο τα αποτελέσματα θεωρούνται στατιστικώς σημαντικά είναι  $p < 0.05$ .

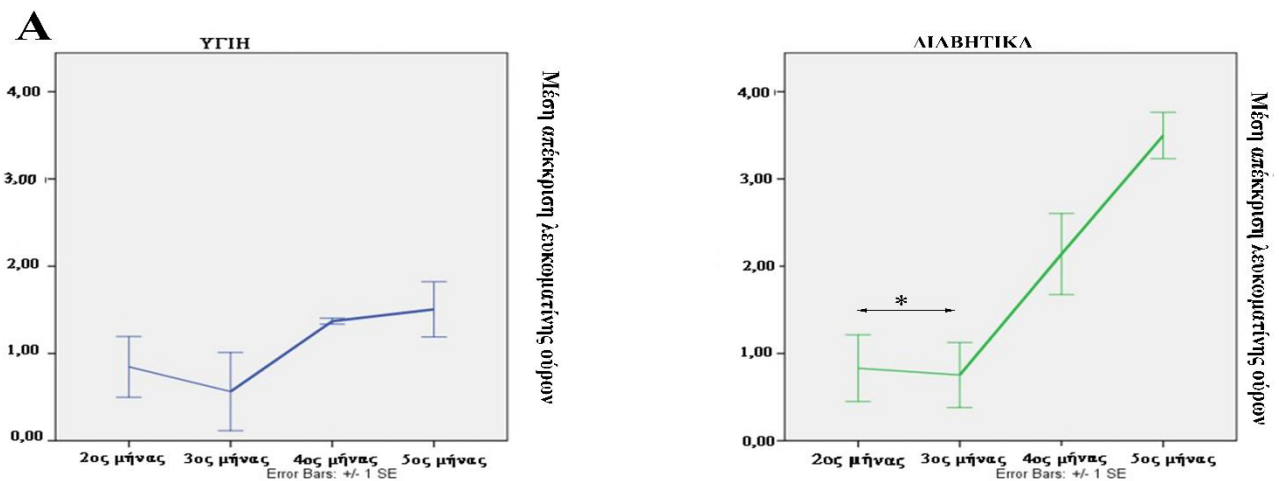


### 3. Αποτελέσματα

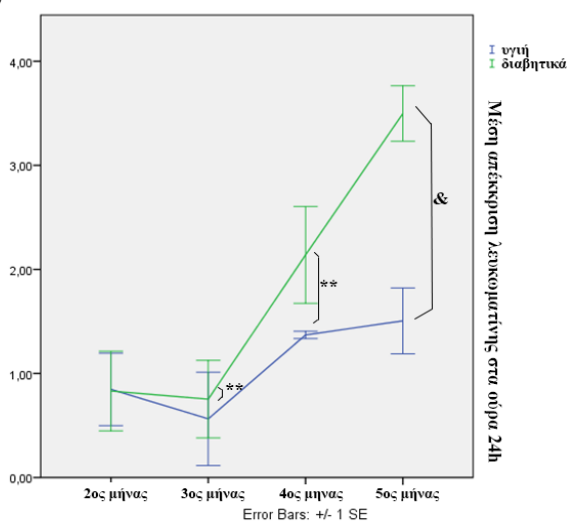
#### 3.1 Κλινικές και Βιοχημικές Παράμετροι

##### 3.1.1 Απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα 24h

Παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της απέκκρισης λευκωματίνης ανά 24h στα ούρα των διαβητικών πειραματοζώων, από την επαγωγή του σακχαρώδους διαβήτη μέχρι τον πέμπτο μήνα της παρακολούθησής τους ( $p < 0.0005$ , repeated measures ANOVA). Τότε, τα διαβητικά πειραματοζώα χωρίστηκαν στις ομάδες Dm και DmRx (υπό λοσαρτάνη) και τα υγιή σε Ctrl και CtrlRx (υπό λοσαρτάνη) και έγινε η έναρξη χορήγησης της λοσαρτάνης. (Εικ3)



**B**

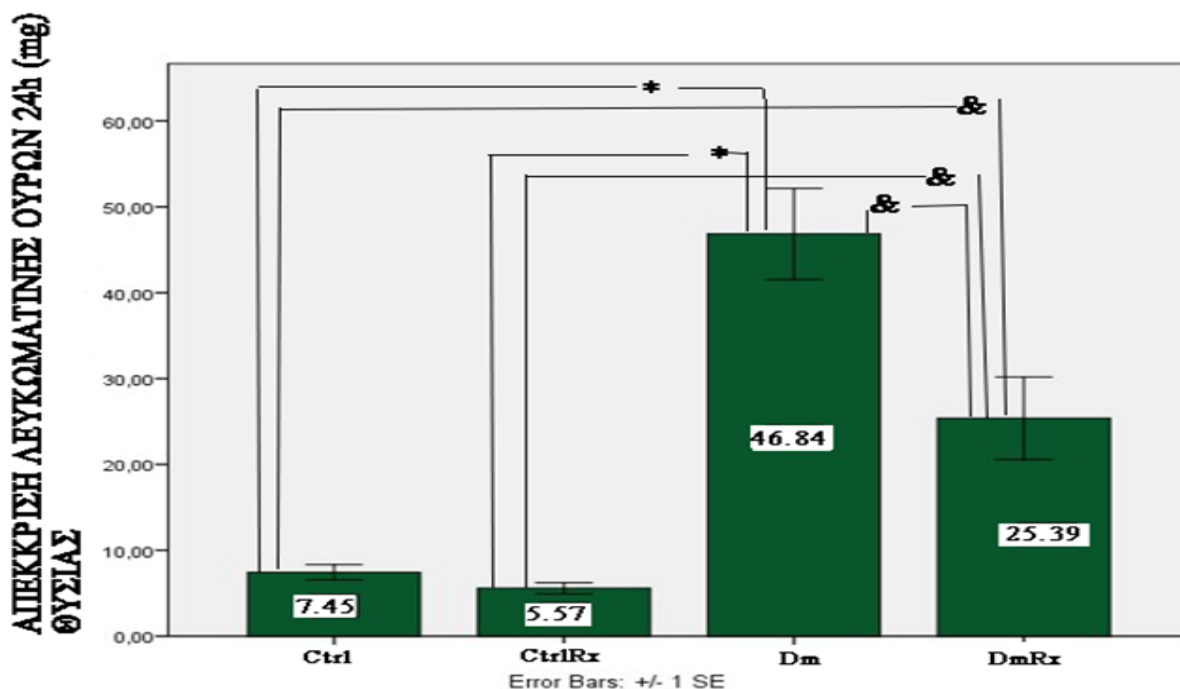


**Εικόνα 3** Απέκκριση λευκωματίνης ούρων 24h (mg) για τους 5 πρώτους μήνες της παρακολούθησης. Παρατηρείται σταδιακή αύξηση της απέκκρισης λευκωματίνης στα ούρα 24ώρου των διαβητικών πειραματοζώων. Η τιμή της λευκωματίνης αντιπροσωπεύει μέση τιμή μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό  $\pm$  τυπικό σφάλμα. **(A)** Στην ομάδα των διαβητικών πειραματοζώων, σε ό,τι αφορά την σύγκριση για την απέκκριση λευκωματίνης ούρων 24ώρου από τον 2<sup>ο</sup> προς τον 3<sup>ο</sup> μήνα της παρακολούθησης ισχύει  $* p=1$ , ενώ για όλες τις υπόλοιπες συγκρίσεις ισχύει  $p < 0.0005$ . Για την ομάδα των υγιών πειραματοζώων, ισχύει  $p > 0.1$  για όλες τις συγκρίσεις. **(B)** Τον πέμπτο μήνα της παρακολούθησης, παρατηρείται σημαντική διαφορά στην απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα 24h, ανάμεσα στα υγιή και τα διαβητικά πειραματοζώα,  $\& p=0.0002$ ,  $**p > 0.1$

Δύο μήνες μετά την έναρξη της λοσαρτάνης και ακριβώς πριν τη θυσία, έγινε συλλογή ούρων 24h προς μέτρηση απέκκρισης λευκωματίνης. Παρατηρήθηκε μείωση της απέκκρισης λευκωματίνης στα διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. (Εικ 4) Το σωματικό βάρος των πειραματοζώων, το μέσο βάρος των νεφρών προς σωματικό βάρος και τα υπόλοιπα κλινικά δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1

**Πίνακας 1** Κλινικές και βιοχημικές παράμετροι των υπό μελέτη ομάδων (μέση τιμή ± ΤΣ)

	<b>Ctrl</b>	<b>CtrlRx</b>	<b>Dm</b>	<b>DmRx</b>	<b>p</b>
Σωματικό βάρος (gr) (ΣΒ)	504±11.8	531±5.8	334±8.8	336±20	p<0.001 για Ctrl και CtrlRx έναντι Dm και DmRx
Βάρος νεφρών/ΣΒ	0.0026±0.00003	0.0027±0.00007	0.0054±0.000097	0.0053±0.000089	p<0.001 για Ctrl και CtrlRx έναντι Dm και DmRx
A1c(%)	9.7±0.34	8.97±0.32	19.73±0.2	19.48±0.53	p<0.001
Λευκωματίνη ούρων θυσίας (mg/24h)	7.45±0.89	5.57±0.66	46.84±5.3	25.39±4.8	p<0.001 για Ctrl και CtrlRx έναντι Dm. p<0.05 για Ctrl και CtrlRx έναντι DmRx, όπως και για Dm έναντι DmRx)
Κρεατινίνη αίματος/ ΣΒ	0.0013±0.000091	0.0012±0.0001	0.0027±0.0001	0.0027±0.0002	p<0.001 για Ctrl και CtrlRx έναντι Dm και DmRx



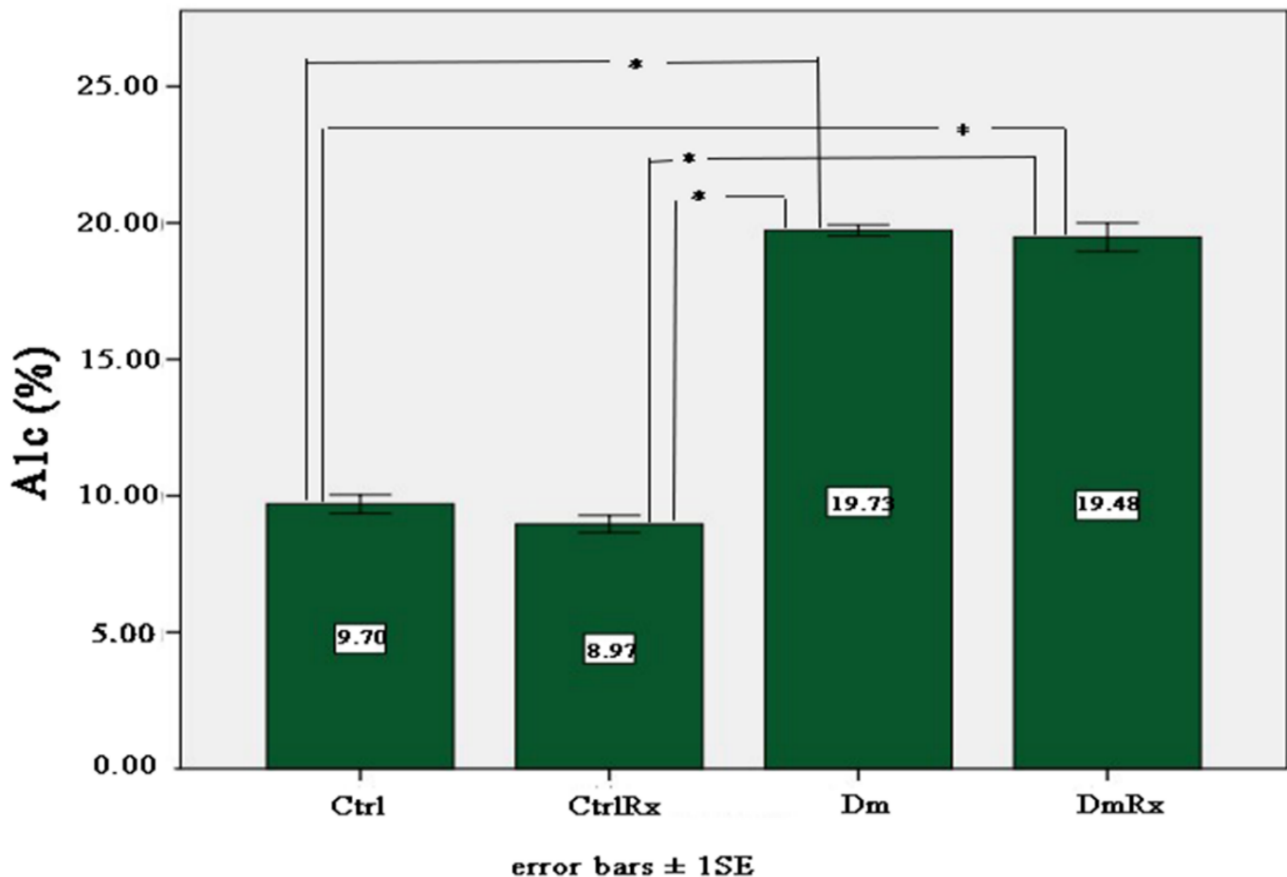
**Εικόνα 4** Απέκκριση λευκωματίνης ούρων 24h θυσίας (mg). Ctrl: υγιή πειραματόζωα, CtrlRx: υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, Dm: διαβητικά πειραματόζωα, DmRx: διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. Παρατηρείται μείωση της 24h απέκκρισης λευκωματίνης στα ούρα των διαβητικών πειραματοζώων υπό λοσαρτάνη. Η τιμή της λευκωματίνης αντιπροσωπεύει μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα. ANOVA με διόρθωση κατά Games- Howell. (\*  $p < 0.001$ , &  $p < 0.05$ )

### 3.1.2 Μέτρηση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης στο αίμα

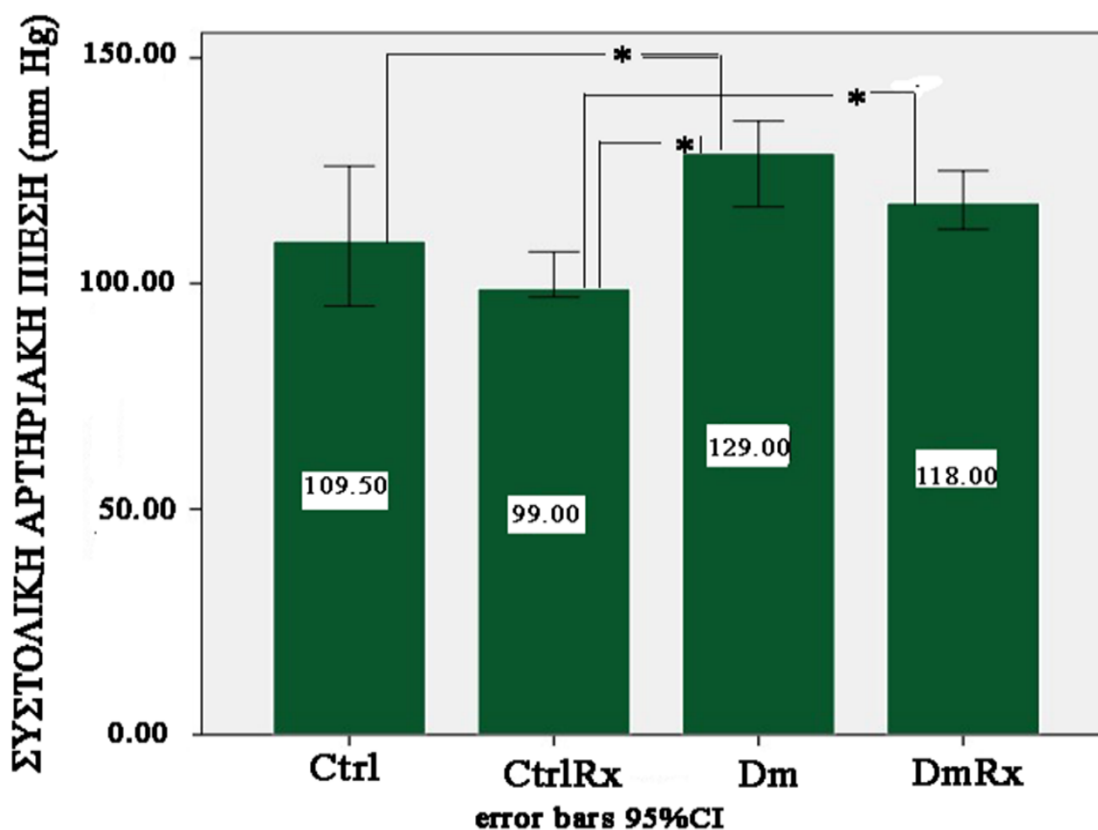
Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (A1c) στις ομάδες των διαβητικών πειραματοζώων Dm και DmRx ( $19,73\% \pm 0,2$  και  $19,48\% \pm 0,53$  αντιστοίχως) σε σχέση με τις ομάδες των υγιών Ctrl και CtrlRx ( $9,7\% \pm 0,34$  και  $9\% \pm 0,32$  αντιστοίχως,  $p < 0.001$  για τις συγκρίσεις Dm έναντι Ctrl και CtrlRx, DmRx έναντι Ctrl και CtrlRx) (Εικ 5). Η απόλυτη τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης των πειραματοζώων δεν αντιστοιχεί στις τιμές που δίνει η βιβλιογραφία. Αυτό οφείλεται στο ότι οι μετρήσεις της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης έγιναν σε μικροβιολογικό εργαστήριο για ανθρώπινες μετρήσεις, επειδή δεν υπήρχε άλλη δυνατότητα να μετρηθούν. Όμως είναι σαφής η διαφορά μεταξύ υγιών μαρτύρων και διαβητικών πειραματοζώων, το οποίο ήταν και το ζητούμενο.

### 3.1.3 Συστολική αρτηριακή πίεση θυσίας (mmHg)

Παρατηρήθηκε αύξηση της συστολικής αρτηριακής πίεσης (ΣΑΠ) στα διαβητικά πειραματόζωα σε σχέση με τα υγιή. Συγκεκριμένα η μέση ΣΑΠ (95% διάστημα εμπιστοσύνης) στα διαβητικά πειραματόζωα ήταν 129 (124,49- 136,78) ενώ στα υγιή 109,5 (99,82- 119,51),  $p < 0.001$  για τη σύγκριση Dm έναντι Ctrl. Η χορήγηση της λοσαρτάνης στους διαβητικούς επίμυες δεν είχε σημαντική επίδραση στη συστολική αρτηριακή πίεση (Εικ 6).



**Εικόνα 5** Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (A1c) των υπό μελέτη ομάδων. Ctrl: υγιή πειραματόζωα, CtrlRx: υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, Dm: διαβητικά πειραματόζωα, DmRx: διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. Η τιμή της A1c αντιπροσωπεύει μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα. ANOVA με διόρθωση κατά Games- Howell. (\*  $p < 0.001$ )



**Εικόνα 6** Συστολική αρτηριακή πίεση στις υπό μελέτη ομάδες. Ctrl: υγιή πειραματόζωα, CtrlRx: υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, Dm: διαβητικά πειραματόζωα, DmRx: διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. Η τιμή της συστολικής αρτηριακής πίεσης αντιπροσωπεύει τη διάμεσο (95% διάστημα εμπιστοσύνης). Kruskal- Wallis με συγκρίσεις ανά ζεύγη κατά Dunn. (\*  $p < 0.001$ )

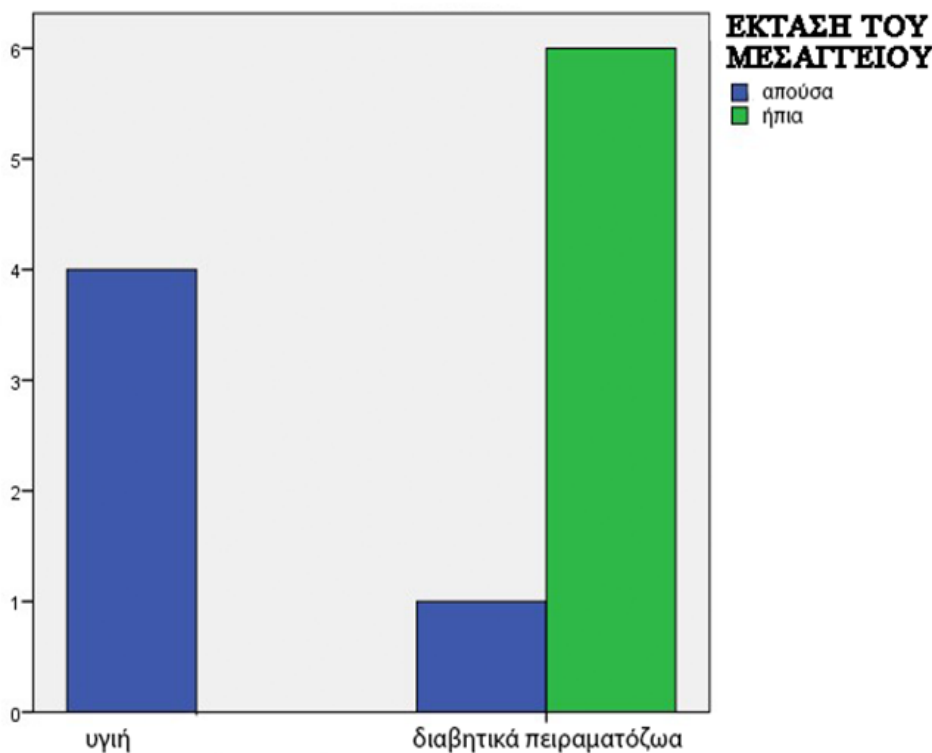
### 3.2 Εκτίμηση της έκτασης του μεσαγγείου.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p=0.015$ ) της έκτασης του μεσαγγείου στα διαβητικά πειραματόζωα σε σχέση με τα υγιή (Εικ 7,8). Ως συνέπεια της επίδρασης της λοσαρτάνης στα διαβητικά πειραματόζωα διαπιστώθηκε τάση για μείωση της έκτασης του μεσαγγείου χωρίς να προκύψει στατιστική σημαντικότητα (Εικ7,8,9).

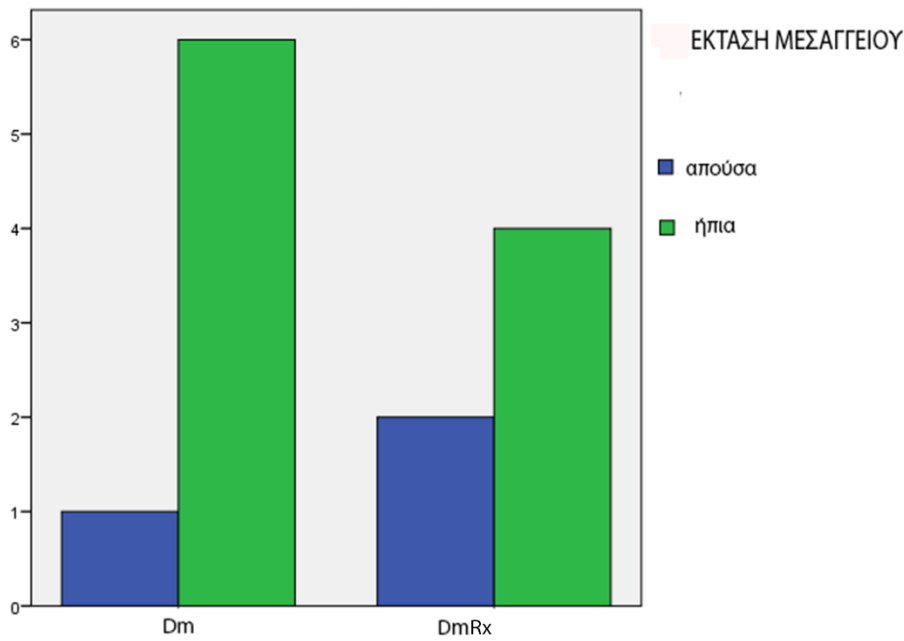
### 3.3 Επίδραση της λοσαρτάνης στο πάχος της βασικής μεμβράνης του σπειράματος (nm).

Το μέσο πάχος της βασικής μεμβράνης του σπειράματος ( $\pm$  τυπικό σφάλμα) στα διαβητικά πειραματόζωα ήταν  $342.76 \pm 5.16$ , στα υγιή  $283.29 \pm 8.16$  και τα υγιή υπό λοσαρτάνη  $287.10 \pm 14.86$ . Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους της βασικής μεμβράνης στα διαβητικά πειραματόζωα σε σχέση με τις ομάδες των υγιών

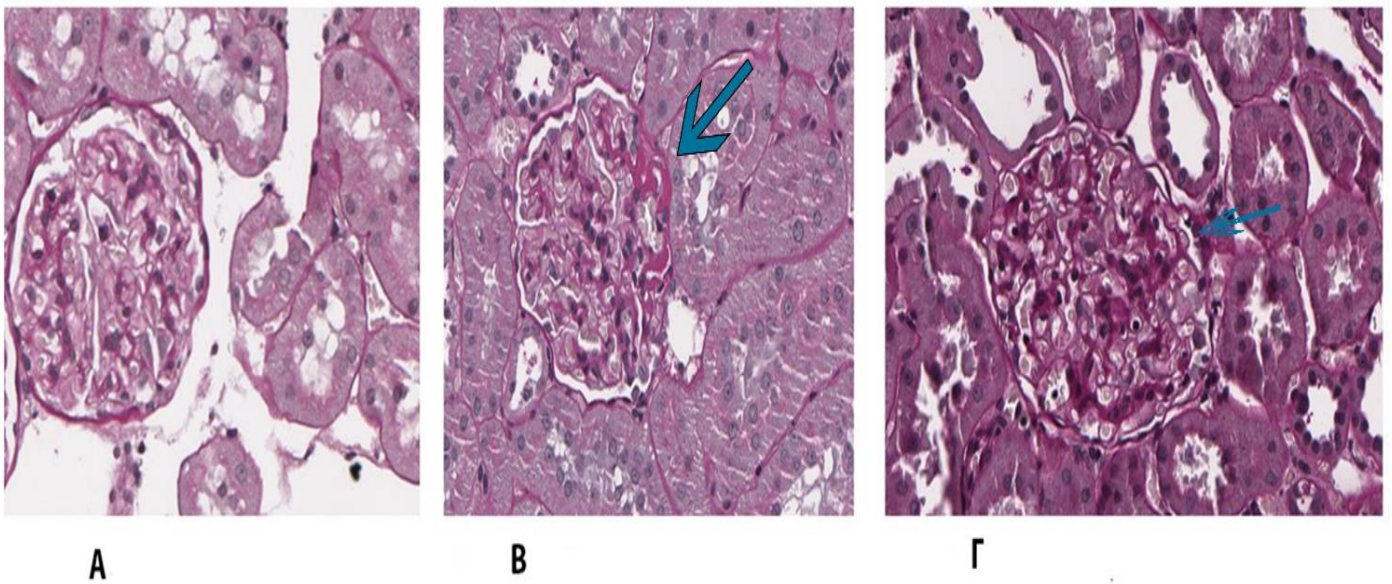
(πάχος βασικής μεμβράνης σε Dm έναντι Ctrl και CtrlRx  $p < 0.001$  και  $p < 0.05$  αντιστοίχως). Η χορήγηση της λοσαρτάνης οδήγησε σε μείωση του πάχους της βασικής μεμβράνης στα διαβητικά πειραματόζωα ( $292,39 \pm 3,04$ ) σε σχέση με τους αντίστοιχους διαβητικούς μάρτυρες ( $p < 0.001$  για τη σύγκριση μεταξύ Dm και DmRx). (Εικ 10)



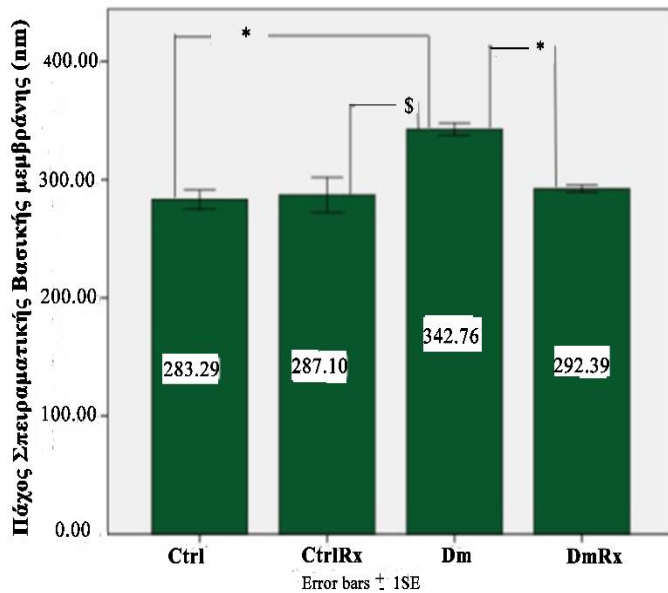
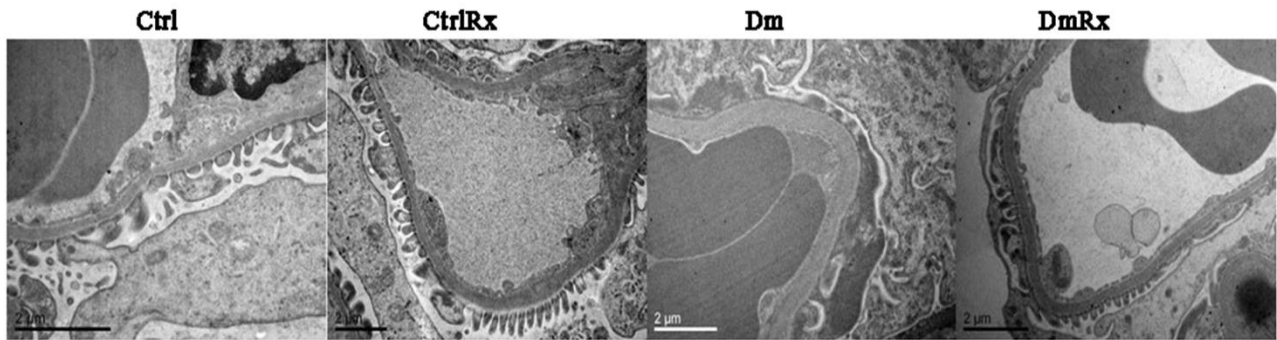
**Εικόνα 7** Εκτίμηση της έκτασης του μεσαγγείου σε διαβητικά και υγιή πειραματόζωα. (ακριβές κριτήριο του Fisher,  $p = 0.015$ )



**Εικόνα 8** Εκτίμηση της επίδρασης της λοσαρτάνης στην έκταση του μεσαγγείου στα διαβητικά πειραματόζωα (Dm) και τα διαβητικά υπό λοσαρτάνη (DmRx). (ακριβές κριτήριο του Fisher,  $p=0.5$ )



**Εικόνα 9** Φωτονικό μικροσκόπιο  $\times 400$  (χρώση υπεριοδικού οξέος-Schiff, PAS). (A) Υγιές πειραματόζωο με φυσιολογικό μεσάγγειο, (B) Διαβητικό πειραματόζωο, (Γ) Διαβητικό πειραματόζωο υπό λοσαρτάνη. Με τα βέλη υποσημαίνονται ενδεικτικά περιοχές αυξημένης έκτασης του μεσαγγείου.



**Εικόνα 10** Εκτίμηση του πάχους (nm) της βασικής μεμβράνης του σπειράματος στις υπό μελέτη ομάδες. Ctrl: υγιή πειραματόζωα, CtrlRx: υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, Dm: διαβητικά πειραματόζωα, DmRx: διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. Η τιμή του πάχους της βασικής μεμβράνης αντιπροσωπεύει μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα. ANOVA με διόρθωση κατά Games- Howell. (\*  $p < 0.001$ , \$  $p < 0.05$ ).

### 3.4 Πρωτεΐνη mTOR και φωσφορυλιωμένη (ενεργοποιημένη) πρωτεΐνη mTOR

#### 3.4.1 Ποσοτική εκτίμηση της πρωτεΐνης mTOR στο σπείραμα.(Εικ 11)

Στο επίπεδο του σπειράματος, ο σακχαρώδης διαβήτης είχε ως συνέπεια την αύξηση της mTOR, και συγκεκριμένα υπήρξε 12% αύξηση στην ομάδα των διαβητικών αρουραίων σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες ( $p < 0.05$ ). Η λοσαρτάνη προκάλεσε μια μικρή αλλά όχι σημαντική μείωση της σπειραματικής mTOR, αποτέλεσμα το οποίο προέκυψε συγκρίνοντας Dm και DmRx. Από την άλλη πλευρά, η έλλειψη διαφοράς στην ποσότητα της mTOR, μεταξύ Ctrl και DmRx, υποδεικνύει ότι η λοσαρτάνη προκάλεσε μείωση των επιπέδων της σπειραματικής mTOR προς το φυσιολογικό.



### 3.4.2 Ποσοτική εκτίμηση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης mTOR στο σπείραμα.

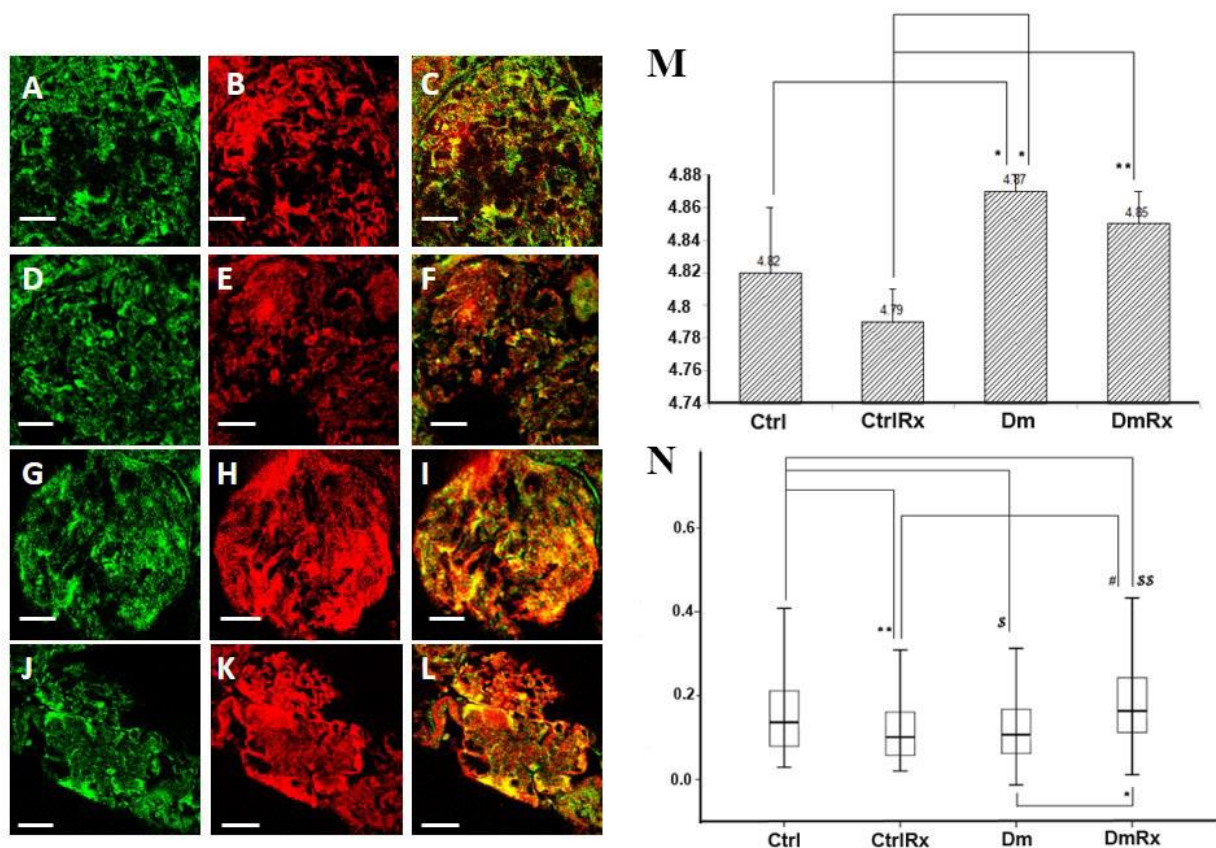
(Εικ 12)

Σε ότι αφορά την ενεργοποιημένη mTOR (pTOR2448) στις ομάδες των υγιών πειραματοζώων, η λοσαρτάνη δεν είχε καμία επίδραση. Συγκρίνοντας διαβητικά πειραματόζωα και διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της σπειραματικής pTOR2448 στην ομάδα της θεραπείας (συγκεκριμένα 31.8% μείωση στους DmRx αρουραίους σε σχέση με τους Dm,  $p < 0.05$ ). Σε ότι αφορά την επίδραση του σακχαρώδους διαβήτη στην pTOR2448, συγκρίνοντας τους διαβητικούς αρουραίους με τους υγιείς, όπως επίσης τους διαβητικούς αρουραίους υπό λοσαρτάνη με τους αντίστοιχους υγιείς με θεραπεία, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της pTOR2448 στα διαβητικά πειραματόζωα (58.4% and 20.2%, αντίστοιχα,  $p < 0.05$  και για τις δύο συγκρίσεις). Όμως η σπειραματική mTOR ακολούθησε την ίδια τάση σε ότι αφορά τις συγκρίσεις στις προαναφερθείσες ομάδες. (Εικ 11) Δεδομένου τα επίπεδα mTOR δε διέφεραν ανάμεσα σε πειραματόζωα των ομάδων Ctrl και CtrlRx, όπως επίσης και των ομάδων Ctrl και DmRx, ενώ η σπειραματική pTOR2448 ήταν ίδια στους αρουραίους των ομάδων Ctrl και CtrlRx, αλλά αυξημένη στην ομάδα DmRx μπορούμε να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι ο σακχαρώδης διαβήτης προκάλεσε αύξηση στη φωσφορυλίωση στη θέση Ser2448 της mTOR στο σπείραμα. Από την άλλη πλευρά, η θεραπεία με λοσαρτάνη στα διαβητικά πειραματόζωα μερικώς αποκατέστησε τη σπειραματική pTOR2448 προς το φυσιολογικό.

### 3.4.3 Ποσοτική εκτίμηση της πρωτεΐνης mTOR στα ποδοκύτταρα.

Η πρωτεΐνη του σχισμοειδούς διαφράγματος, νεφρίνη χρησιμοποιήθηκε ως ειδικός ποδοκυτταρικός δείκτης. Η ανάλυση με ανοσοστύπωμα κατά Western (Western blot-WB) δεν ανέδειξε διαφορές στην πρωτεϊνική έκφραση της νεφρίνης στις υπό μελέτη ομάδες. (Εικ 13). Τα ποδοκύτταρα των διαβητικών πειραματοζώων υπό θεραπεία είχαν περισσότερη πρωτεΐνη mTOR σε σχέση με τις άλλες ομάδες (61.4%, 53% και 21% αύξηση εν συγκρίσει με CtrlRx, Dm, και Ctrl αρουραίους, αντίστοιχως,  $p < 0.05$  Εικ 11). Επιπλέον, στην ομάδα CtrlRx διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα της ποδοκυτταρικής mTOR

ήταν λιγότερη σε σχέση με την ομάδα Ctrl (36% μείωση,  $p < 0.05$  Εικ 11). Ο σακχαρώδης διαβήτης συσχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα mTOR στα ποδοκύτταρα (28% μείωση στους αρουραίους Dm σε σχέση με τους αρουραίους της ομάδας Ctrl,  $p < 0.05$  Εικ 11). Η λοσαρτάνη προκάλεσε μείωση στην ποδοκυτταρική mTOR στα υγιή πειραματόζωα ενώ οδήγησε σε αύξηση της mTOR στα ποδοκύτταρα των διαβητικών αρουραίων. Παρατηρούμε, επομένως, πως η λοσαρτάνη διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο στην πρωτεϊνική έκφραση της ποδοκυτταρικής mTOR σε ό,τι αφορά τα υγιή και τα διαβητικά πειραματόζωα.



**Εικόνα 11 Σπειραματική mTOR (πράσινο), νεφρίνη (κόκκινο) και συνεντόπιση (κίτρινο).** Ctrl (A, B, C), CtrlRx (D, E, F), Dm (G,H, I) και DmRx (J, K, L). Μέση ένταση φθορισμού mTOR στο σπείραμα (M). Συντελεστής Pearson's για νεφρίνη/ mTOR που αντιπροσωπεύει την ποδοκυτταρική mTOR στις υπό μελέτη ομάδες (N). Ctrl: υγιή πειραματόζωα, CtrlRx: υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, Dm: διαβητικά πειραματόζωα, DmRx: διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. Η μέση ένταση φθορισμού mTOR στο σπείραμα αντιπροσωπεύει μέση τιμή μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό + τυπικό σφάλμα (\* $p < 0.001$ , \*\* $p = 0.002$ ). Η τιμή του συντελεστή Pearson's αντιπροσωπεύει τη διάμεσο (\* $p < 0.001$ , \*\* $p = 0.003$ , \$ $p = 0.005$ , \$\$ $p = 0.029$ , # $p = 0.001$ ). Κλίμακα 30  $\mu\text{m}$

#### 3.4.4 Ποσοτική εκτίμηση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης mTOR στα ποδοκύτταρα.

Η ενεργοποίηση της mTOR εξετάσθηκε με τη μέτρηση της φωσφορυλιωμένης mTOR στη θέση Ser2448 (pTOR2448) στα ποδοκύτταρα (Εικ 12). Παρόλο που η έκφραση της ποδοκυτταρικής pTOR2448 ήταν ίδια, κατά απόλυτο τιμή, στις ομάδες Ctrl και CtrlRx, τα χαμηλότερα επίπεδα mTOR στην ομάδα των CtrlRx, (Εικ 11) υποδεικνύει αύξηση στη φωσφορυλίωση της mTOR στη θέση Ser2448 στα υγιή πειραματόζωα που ελάμβαναν λοσαρτάνη. Σε ό,τι αφορά την επίπτωση της λοσαρτάνης στους διαβητικούς αρουραίους, το παρατηρούμενο αποτέλεσμα ήταν διαφορετικό: παρόλο που δεν υπήρχε καμία διαφορά στα επίπεδα της ποδοκυτταρικής pTOR2448 μεταξύ Dm και DmRx, (Εικ 12) η αυξημένη ποδοκυτταρική έκφραση της mTOR στην ομάδα των DmRx (Εικ11), υποδηλώνει σχετική μείωση της φωσφορυλιωμένης mTOR (pTOR2448) συνεπεία της θεραπείας με λοσαρτάνη στα ποδοκύτταρα των DmRx. Εξετάζοντας την επίδραση του σακχαρώδη διαβήτη στην ποδοκυτταρική pTOR2448, τα αποτελέσματα έχουν ως εξής: Επειδή τα επίπεδα της ποδοκυτταρικής mTOR ήταν χαμηλότερα στα διαβητικά (Dm) πειραματόζωα σε σχέση με τα υγιή Ctrl ενώ, η pTOR2448 ήταν αυξημένη στην ομάδα Dm σε σχέση με την ομάδα Ctrl (44.5% αύξηση σε Dm σε σύγκριση με Ctrl αρουραίων,  $p < 0.05$  Εικ 12), προκύπτει ότι ο σακχαρώδης διαβήτης προκάλεσε αύξηση στην ποδοκυτταρική pTOR2448 (ενεργός mTOR στα ποδοκύτταρα).

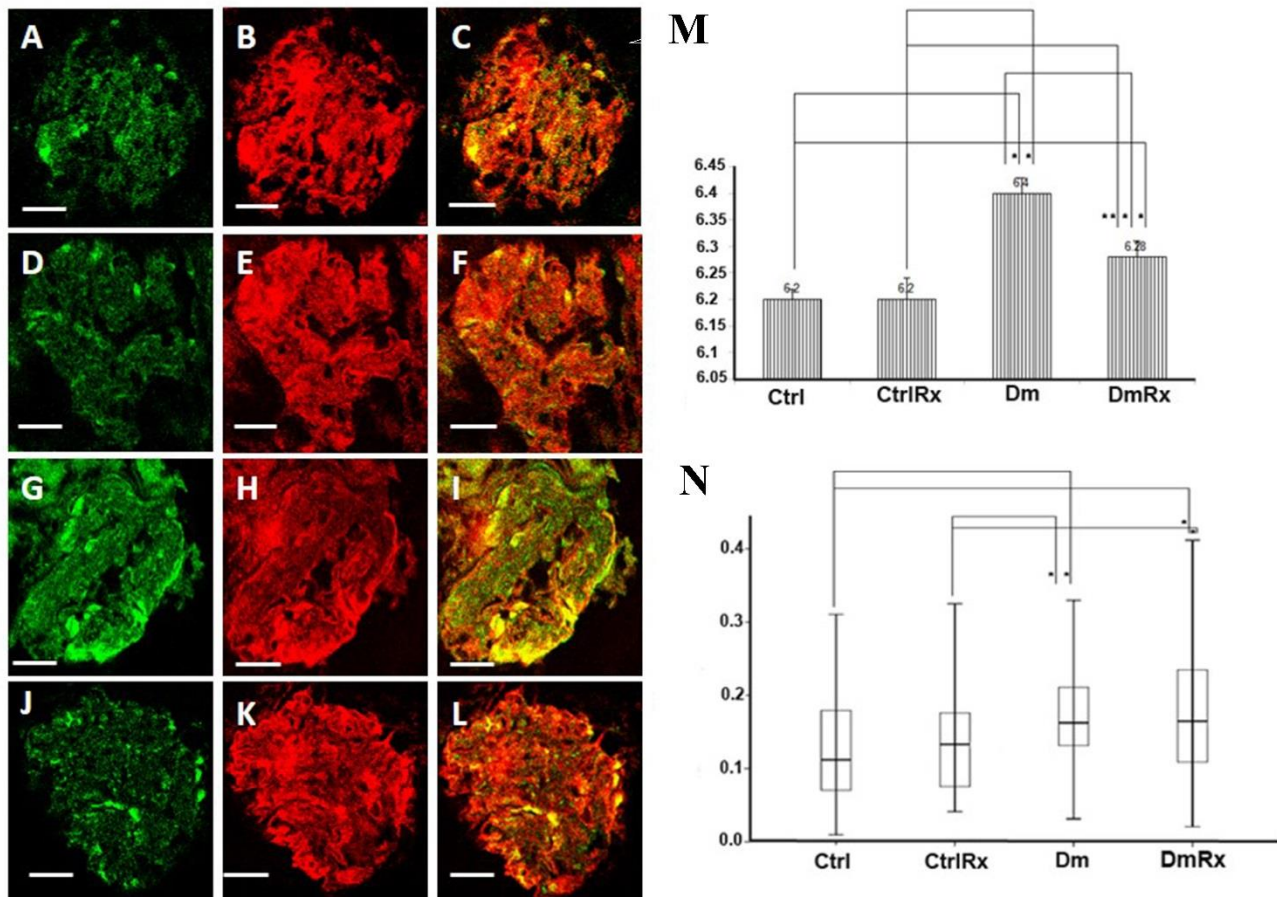
#### 3.4.5 Πρωτεΐνη ολική AKT (tAKT) και φωσφορυλιωμένη (ενεργοποιημένη) tAKT

Θεωρήσαμε την πρωτεΐνη ολική AKT πλήρως ενεργοποιημένη όταν είναι φωσφορυλιωμένη στις θέσεις Ser473 (pAKT473) και Thr308 (pAKT308).

#### 3.4.6 Ποσοτική εκτίμηση της ολικής AKT (tAKT) στο σπείραμα.

Στο σπείραμα τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ολικής AKT ήταν αυξημένα στα διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη (9.6% αύξηση σε σχέση με την ομάδα Dm,  $p < 0.05$  Εικ 14,15), ενώ ήταν μειωμένα στα υγιή πειραματόζωα που ελάμβαναν λοσαρτάνη (25.8% μείωση σε CtrlRx σε σχέση με Ctrl,  $p < 0.05$  Εικ 14,15). Τα διαβητικά πειραματόζωα

παρουσίαζαν αυξημένη ολική AKT στα σπειράματά τους σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, εύρημα το οποίο προέκυψε να είναι στατιστικά σημαντικό μόνο με τη μέθοδο του Western Blot και όχι με αυτή του ανοσοφθορισμού.

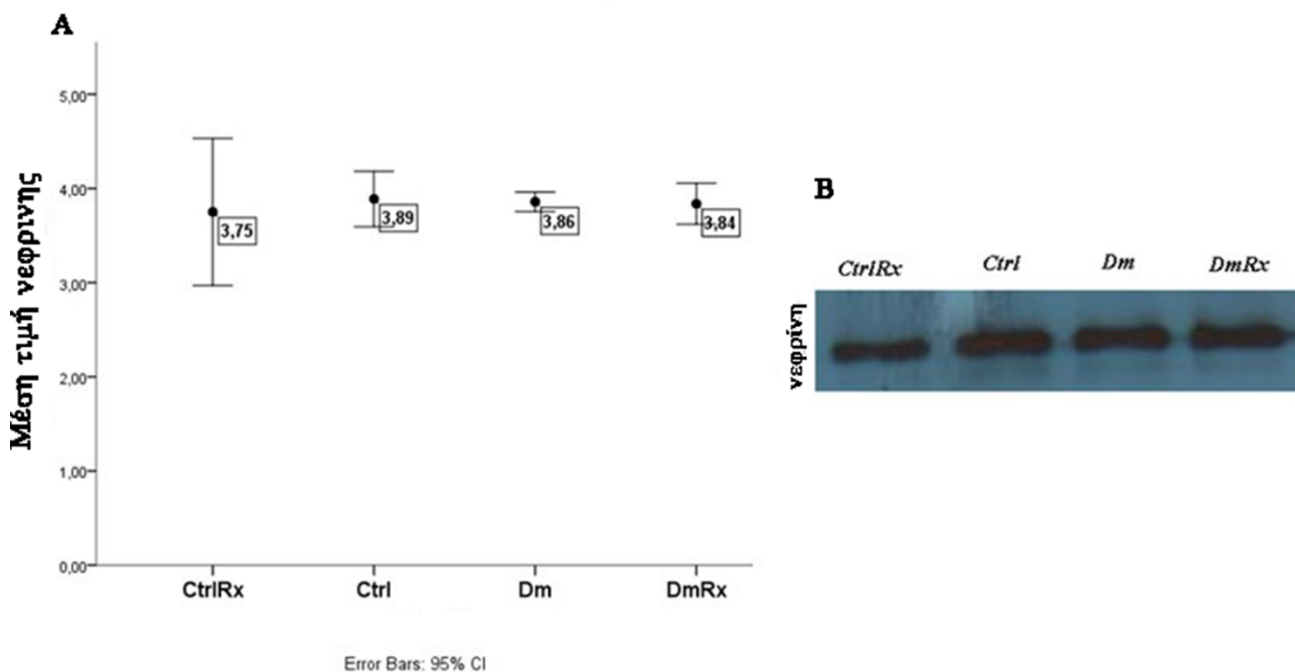


**Εικόνα 12** Σπειραματική pTOR2448 (πράσινο), νεφρίνη (κόκκινο) και συνεντόπιση (κίτρινο). Ctrl (A, B, C), CtrlRx (D, E, F), Dm (G,H, I) και DmRx (J, K, L). Μέση ένταση φθορισμού pTOR2448 στο σπείραμα (M). Συντελεστής Pearson's για νεφρίνη/ pTOR2448 που αντιπροσωπεύει την ποδοκυτταρική pTOR2448 στις υπό μελέτη ομάδες (N). Ctrl: υγιή πειραματόζωα, CtrlRx: υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, Dm: διαβητικά πειραματόζωα, DmRx: διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. Η μέση ένταση φθορισμού pTOR2448 στο σπείραμα αντιπροσωπεύει μέση τιμή μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό + τυπικό σφάλμα (\* $p < 0.001$ , \*\* $p = 0.01$ ).). Η τιμή του συντελεστή Pearson's αντιπροσωπεύει τη διάμεσο (\* $p < 0.001$ ). Κλίμακα 30  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.7 Ποσοτική εκτίμηση της ολικής AKT (tAKT) στα ποδοκύτταρα.

Η λοσαρτάνη προκάλεσε μικρή αύξηση (5.8%) στην ποδοκυτταρική ολική AKT στην ομάδα μελέτης CtrlRx σε σύγκριση με την ομάδα Ctrl ( $p < 0.05$  Εικ 14). Δεν υπήρξε καμία επίδραση της λοσαρτάνης στην ποδοκυτταρική tAKT στα διαβητικά

πειραματόζωα. Ο σακχαρώδης διαβήτης οδήγησε σε αύξηση της tAKT στα ποδοκύτταρα (λαμβάνοντας υπόψιν 5.8% και 31.5% αύξηση στον φθορισμό της ολικής AKT κατά την σύγκριση των Ctrl με τα CtrlRx ή DmRx, αντιστοίχως,  $p < 0.05$  Εικ 14).

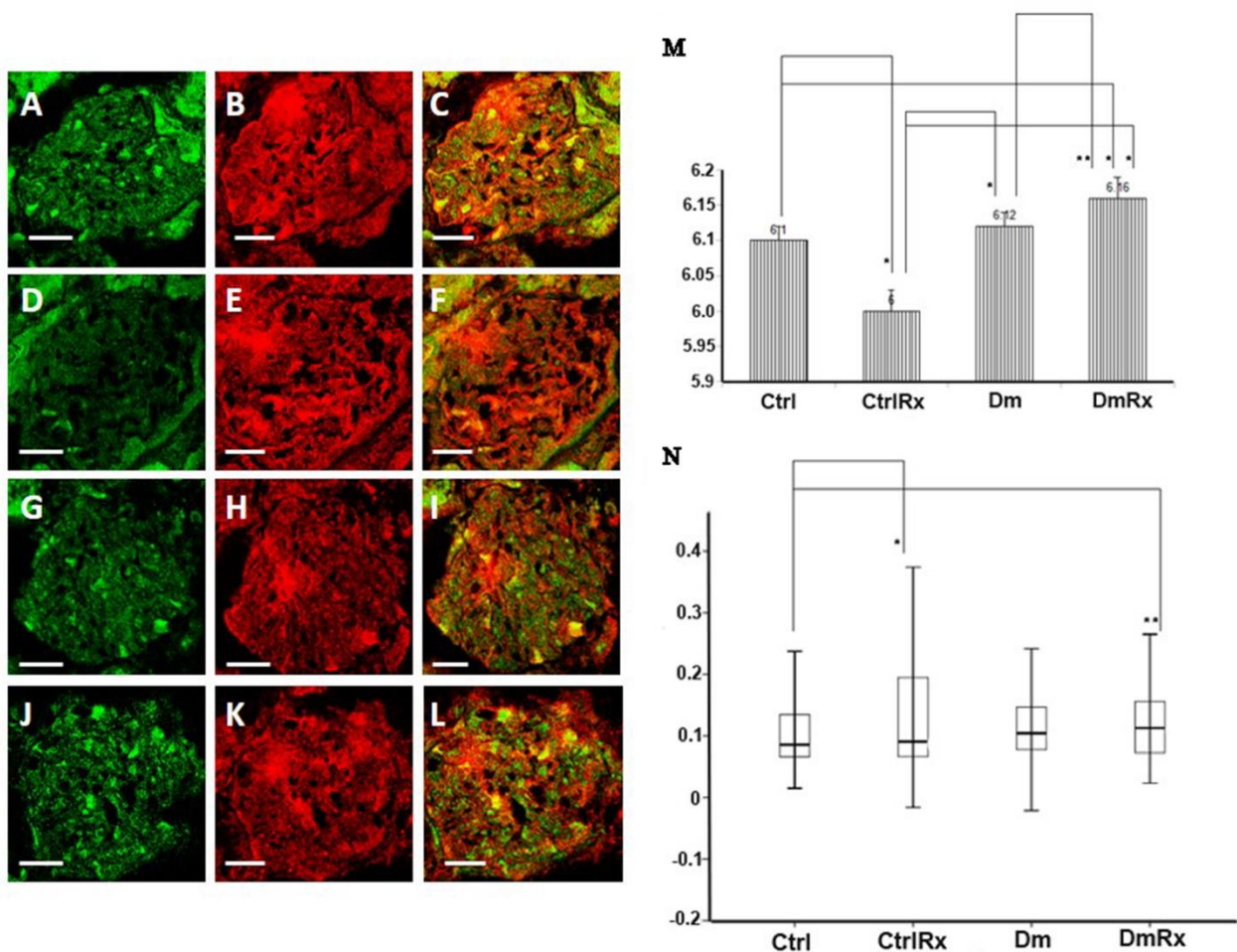


**Εικόνα 13** Ανοσοστύπωμα κατά Western της σπειραματικής νεφρίνης στις υπό μελέτη ομάδες: Γράφημα (A) και ανοσοστύπωμα (B). Ctrl: υγιή πειραματόζωα, CtrlRx: υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, Dm: διαβητικά πειραματόζωα, DmRx: διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. Οι κύκλοι αντιπροσωπεύουν μέση τιμή (95% διάστημα εμπιστοσύνης)  $p=1$  για όλες τις συγκρίσεις. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά ανάμεσα στις υπό μελέτη ομάδες.

### 3.4.8 Ποσοτική εκτίμηση της φωσφορυλιωμένης AKT στη θέση Ser473 (pAKT473) στο σπείραμα.

Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο φθορισμό της σπειραματικής pAKT473 στους υγιείς αρουραίους, σε αντιδιαστολή με τον αντίστοιχο φθορισμό στους υγιείς υπό λοσαρτάνη (23% μείωση σε CtrlRx σε σχέση με Ctrl Εικ 15,16), όμως η ίδια τάση παρατηρήθηκε στις εν λόγω ομάδες μελέτης και σε ό,τι αφορά την ολική AKT στο σπείραμα. Επομένως, βασιζόμενοι στον ανοσοφθορισμό, δεν προκύπτει σαφές συμπέρασμα σε σχέση με την επίδραση της AT1 αναστολής στη σπειραματική pAKT473. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα του Western Blot, η λοσαρτάνη προκάλεσε μείωση στην σπειραματική pAKT473 στους υγιείς μάρτυρες. Ο σακχαρώδης διαβήτης

προκάλεσε ήπια αύξηση στην pAKT473 σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (Ctrl), αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ούτε με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού, αλλά ούτε και με τη μέθοδο του Western Blot. Δεδομένου ότι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της ολικής AKT ήταν λιγότερο στην ομάδα των διαβητικών πειραματοζώων (Dm) σε σχέση με τα διαβητικά υπό λοσαρτάνη (DmRx), οι ίσες ποσότητες pAKT473 στα σπειράματα των Dm και DmRx, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η λοσαρτάνη σε κάποιο βαθμό συγκράτησε τη φωσφορυλίωση της AKT στη θέση Ser473. (Εικ 15,16)

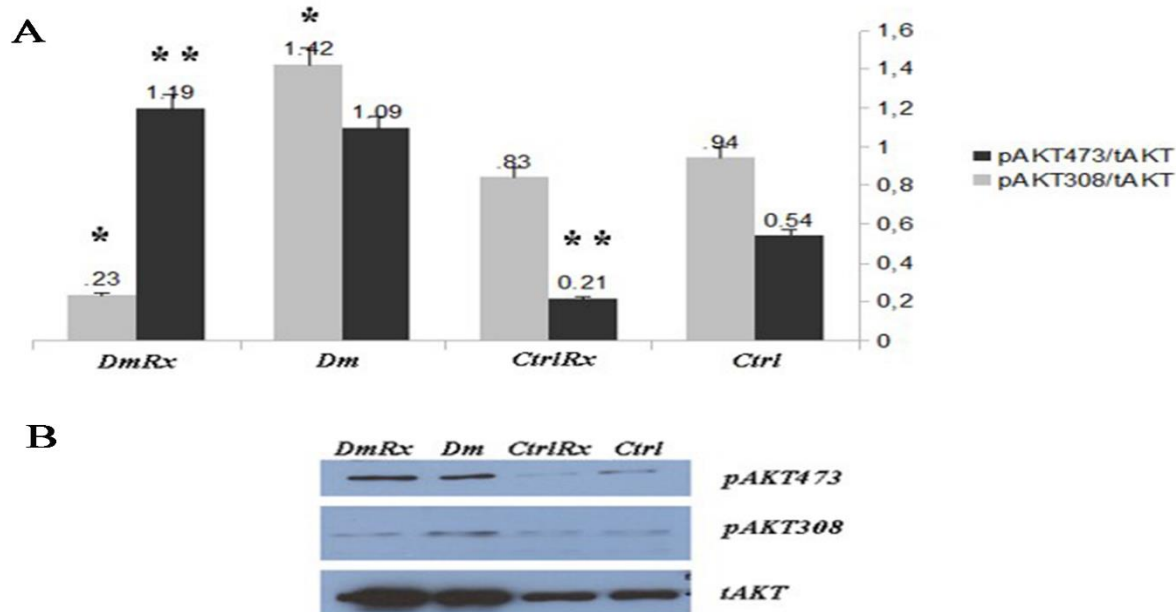


**Εικόνα 14 Σπειραματική tAKT (πράσινο), νεφρίνη (κόκκινο) και συνεντόπιση (κίτρινο). Ctrl (A, B, C), CtrlRx (D, E, F), Dm (G,H, I) και DmRx (J, K, L). Μέση ένταση φθορισμού tAKT στο σπείραμα (M). Συντελεστής Pearson's για νεφρίνη/ tAKT που αντιπροσωπεύει την ποδοκυτταρική tAKT στις υπό μελέτη ομάδες (N). Ctrl: υγιή πειραματόζωα, CtrlRx: υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, Dm: διαβητικά πειραματόζωα, DmRx: διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. Η μέση ένταση φθορισμού tAKT στο σπείραμα αντιπροσωπεύει μέση τιμή μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό + τυπικό σφάλμα (\*p<0.001, \*\*p=0.044). Η τιμή του συντελεστή Pearson's αντιπροσωπεύει τη διάμεσο (\*p=0.017, \*\*p=0.014). Κλίμακα 30 μm.**

### 3.4.9 Ποσοτική εκτίμηση της φωσφορυλιωμένης AKT στη θέση Ser473 (pAKT473) στα ποδοκύτταρα.

Δεδομένου ότι οι διαβητικοί αρουραίοι (Dm) παρουσίαζαν στα ποδοκύτταρά τους τα ίδια επίπεδα ολικής AKT με τους υγιείς μάρτυρες (Ctrl), η παρατηρούμενη μείωση της ποδοκυτταρικής pAKT473 (44% σε Dm σε σύγκριση με Ctrl,  $p < 0.05$  Εικ 14,16), υποδεικνύει κατεσταλμένη φωσφορυλίωση στη Ser473 στα ποδοκύτταρα της ομάδας Dm. Η λοσαρτάνη στα διαβητικά πειραματόζωα δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στα επίπεδα της ποδοκυτταρικής pAKT473. Αναφορικά με τους υγιείς αρουραίους, παρόλο που δεν υπήρξε διαφοροποίηση στην pAKT473 στις ομάδες Ctrl και CtrlRx, λόγω της αυξημένης ποσότητας ολικής AKT στην ομάδα CtrlRx, συνάγεται ότι η λοσαρτάνη ελάττωσε την pAKT473 στα ποδοκύτταρα των υγιών αρουραίων.

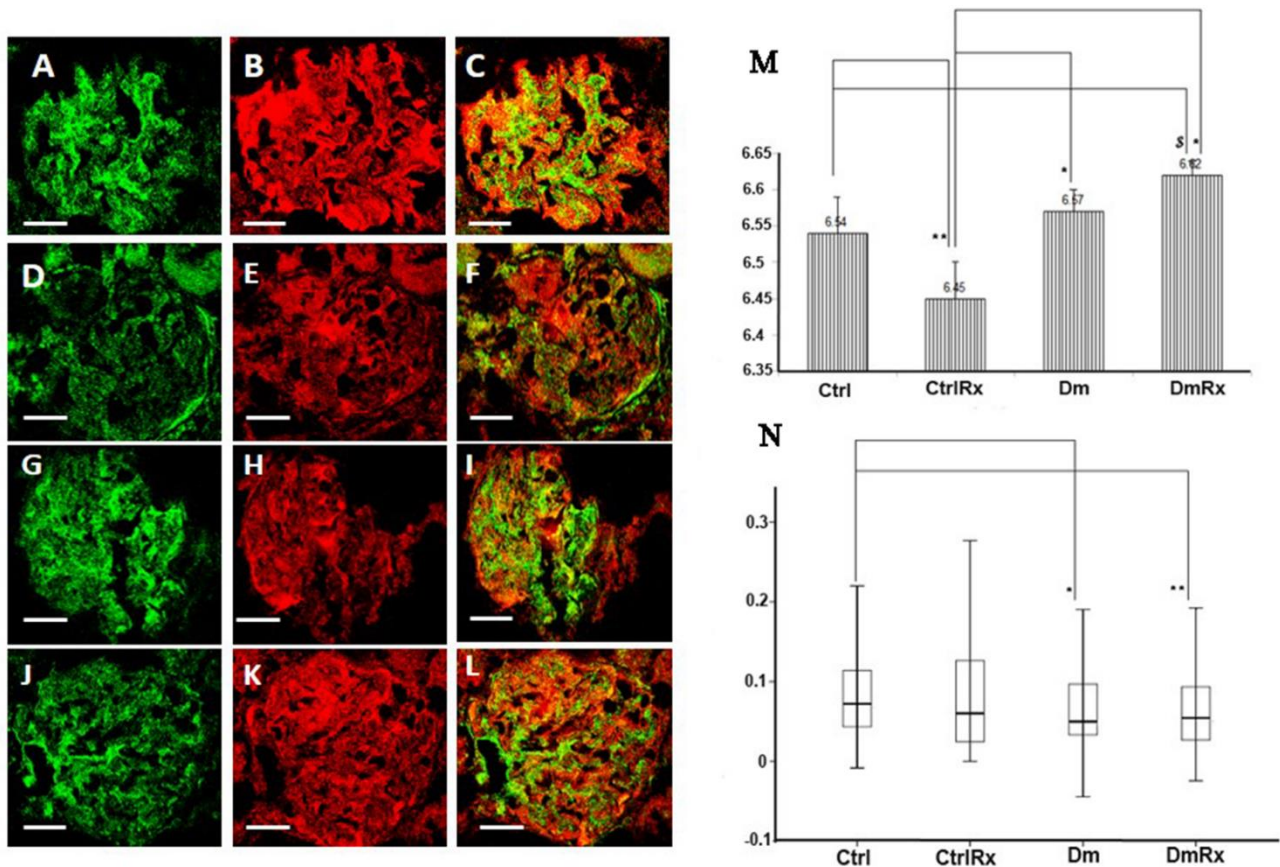
#### ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ pAKT308 & pAKT473 / tAKT



**Εικόνα 15** Ανοσοστύπωμα κατά Western για τη σπειραματική ολική AKT, τη φωσφορυλιωμένη AKT στη θέση Thr308 και φωσφορυλιωμένη AKT στη θέση Ser473 στις υπό μελέτη ομάδες. Γράφημα (A) και ανοσοστύπωμα (B). Ctrl: υγιή πειραματόζωα, CtrlRx: υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, Dm: διαβητικά πειραματόζωα, DmRx: διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μέση τιμή + τυπικό σφάλμα (\*\*pAKT473/tAKT: Ctrl έναντι CtrlRx έναντι DmRx [ $p < 0.05$ ], CtrlRx έναντι Dm έναντι DmRx [ $p < 0.05$ ]; \*pAKT308/ tAKT: Ctrl έναντι Dm έναντι DmRx [ $p < 0.05$ ], CtrlRx έναντι Dm έναντι DmRx [ $p < 0.05$ ], Dm έναντι DmRx [ $p < 0.05$ ]).

### 3.4.10 Ποσοτική εκτίμηση της φωσφορυλιωμένης AKT στη θέση Thr308 (pAKT308) στο σπείραμα.

Ο σακχαρώδης διαβήτης προκάλεσε αύξηση στη φωσφορυλίωση της AKT στη θέση Thr308 όπως διαπιστώθηκε με τις μεθόδους του ανοσοφθορισμού και Western Blot. Το αποτέλεσμα αυτό αντεστράφη από τον AT1 ανταγωνιστή, λοσαρτάνη (Εικ 15,17).



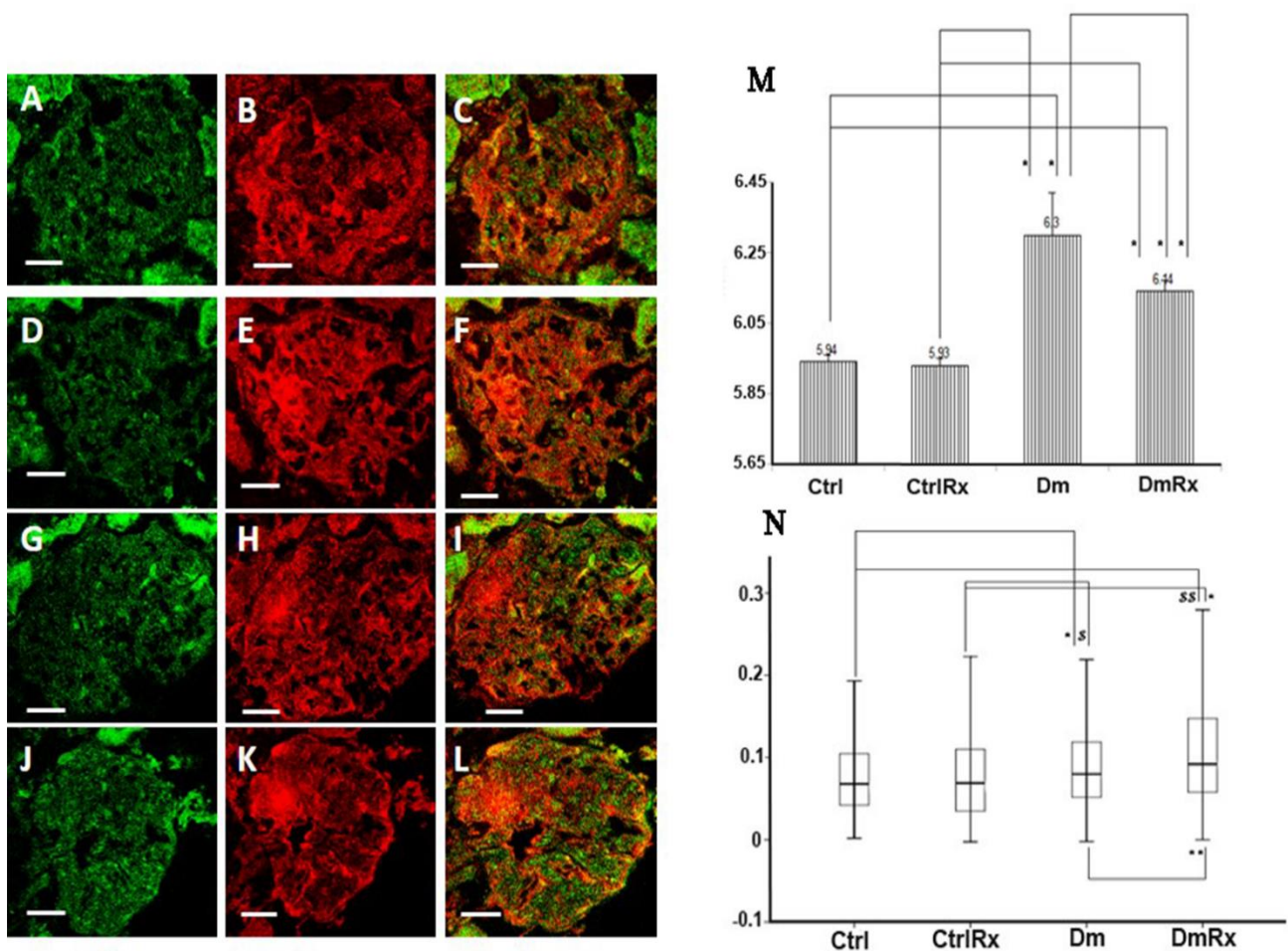
**Εικόνα 16** Σπειραματική pAKT473 (πράσινο), νεφρίνη (κόκκινο) και συνεντόπιση (κίτρινο). Ctrl (A, B, C), CtrlRx (D, E, F), Dm (G,H, I) και DmRx (J, K, L). Μέση ένταση φθορισμού pAKT473 στο σπείραμα (M). Συντελεστής Pearson's για νεφρίνη/ pAKT473 που αντιπροσωπεύει την ποδοκυτταρική pAKT473 στις υπό μελέτη ομάδες (N). Ctrl: υγιή πειραματόζωα, CtrlRx: υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, Dm: διαβητικά πειραματόζωα, DmRx: διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. Η μέση ένταση φθορισμού pAKT473 στο σπείραμα αντιπροσωπεύει μέση τιμή μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό + τυπικό σφάλμα (\*p<0.001, \*\*p=0.011, \$p=0.018). Η τιμή του συντελεστή Pearson's αντιπροσωπεύει τη διάμεσο (\*p=0.016, \*\*p=0.013). Κλίμακα 30  $\mu$ m.

### 3.4.11 Ποσοτική εκτίμηση της φωσφορυλιωμένης AKT στη θέση Thr308 (pAKT308) στα ποδοκύτταρα.

Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ποδοκυτταρική pAKT308 στις ομάδες Ctrl και CtrlRx, λόγω της αυξημένης ολικής AKT στην ομάδα CtrlRx, προκύπτει



ότι η λοσαρτάνη προκάλεσε μείωση της pAKT308. Στα διαβητικά πειραματόζωα η λοσαρτάνη προκάλεσε ήπια αύξηση στην ποδοκυτταρική pAKT308 επειδή τα επίπεδα της pAKT308 ήταν αυξημένα στην ομάδα DmRx σε σχέση με την ομάδα Dm (13.8% αύξηση,  $p < 0.05$  Εικ 17), ενώ δεν υπήρχε καμία διαφορά στην ποδοκυτταρική ολική AKT στις εν λόγω ομάδες (Εικ 14). Ο σακχαρώδης διαβήτης προκάλεσε αύξηση στην ποδοκυτταρική pAKT308, αφού διαπιστώθηκε αυξημένη ένταση φθορισμού της pAKT308 στην ομάδα Dm σε σχέση με Ctrl (Εικ 17), ενώ δεν υπήρχε διαφορά στην ποδοκυτταρική ολική AKT (Εικ 14).



**Εικόνα 17** Πειραματική pAKT308 (πράσινο), νεφρίνη (κόκκινο) και συνεντόπιση (κίτρινο). Ctrl (A, B, C), CtrlRx (D, E, F), Dm (G,H, I) και DmRx (J, K, L). Μέση ένταση φθορισμού pAKT308 στο σπείραμα (M). Συντελεστής Pearson's για νεφρίνη/ pAKT308 που αντιπροσωπεύει την ποδοκυτταρική pAKT308 στις υπό μελέτη ομάδες (N). Ctrl: υγιή πειραματόζωα, CtrlRx: υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη, Dm: διαβητικά πειραματόζωα, DmRx: διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη. Η μέση ένταση φθορισμού pAKT308 στο σπείραμα αντιπροσωπεύει μέση τιμή μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό + τυπικό σφάλμα (\* $p < 0.001$ ). Η τιμή του συντελεστή Pearson's αντιπροσωπεύει τη διάμεσο (\* $p < 0.001$ , \*\* $p = 0.007$ , \$ $p = 0.016$ , \$\$ $p = 0.001$ ). Κλίμακα 30  $\mu\text{m}$ .

#### 4. Συζήτηση

Οι ενεργοποιημένοι AT1 υποδοχείς ασκούν τις δράσεις τους μέσω πρωτεϊνών G, οι οποίες προσελκύουν στην κυτταροπλασματική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης το τριφωσφορικό ινοσιτίδιο (inositol trisphosphate- IP3). Έχει παρατηρηθεί σε καλλιέργειες ανθρώπινων λείων μυικών κυττάρων ότι η αγγειοτασίνη II μέσω του υποδοχέα της προκαλεί ενεργοποίηση του PI3K.[228]

Η λοσαρτάνη είναι ένας ειδικός AT1 ανταγωνιστής και έχει βρεθεί να προκαλεί μείωση της φωσφορυλίωσης της AKT στη θέση Thr308 σε ιστό αορτής που απομονώθηκε από μύες, στους οποίους είχε γίνει επαγωγή σακχαρώδους διαβήτη με στρεπτοζοτοκίνη.[229] Επιπροσθέτως, σε μυοκαρδιακά κύτταρα από επίμυες Wistar όπου είχε γίνει γονιδιακή σίγηση (gene silencing) για τον AT1 υποδοχέα, διαπιστώθηκε μειωμένη φωσφορυλίωση της AKT στις θέσεις Ser473 και Thr308, όταν τα κύτταρα επωάζονταν με τριωδοθυρονίνη.[230] Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι η σηματοδότηση που προέκυπτε από τον AT1 υποδοχέα οδηγούσε στην ενεργοποίηση ολόκληρου του PI3K-AKT-mTOR καταρράκτη. Στο προαναφερθέν σύστημα μελέτης, η λοσαρτάνη ασκούσε παρεμφερείς δράσεις με τη γονιδιακή σίγηση του AT1 υποδοχέα.

Αρκετές μελέτες διενεργήθηκαν για να εκτιμηθεί η επίδραση της ραπαμυκίνης (ειδικός αναστολέας mTOR) στο σηματοδοτικό μονοπάτι AKT-mTOR και στη παθογένεση της βλάβης στη διαβητική νεφροπάθεια.[208, 210, 213] Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα σε ό,τι αφορά την επίδραση της λοσαρτάνης στη σηματοδοτική αλληλουχία AKT-mTOR στο νεφρό.

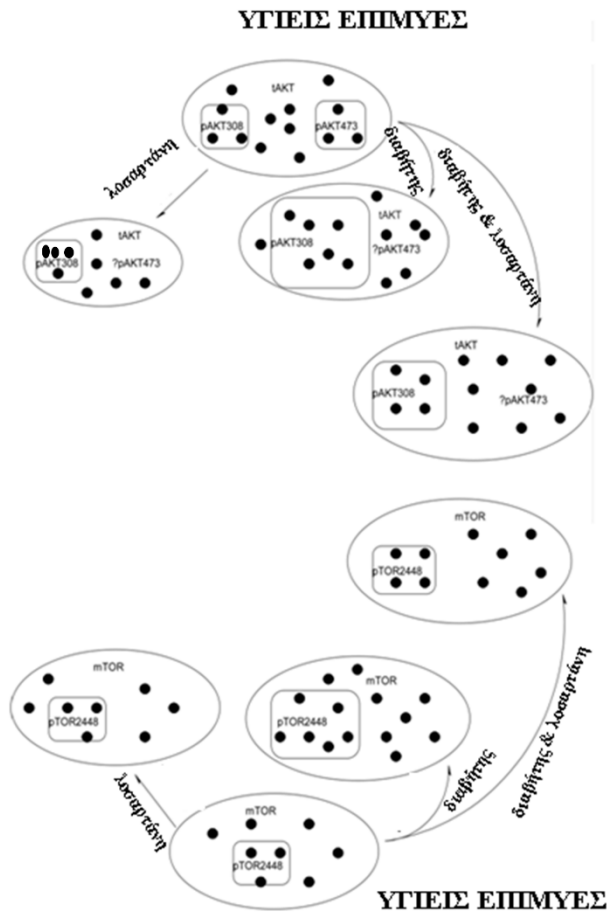
Η PI3K δέχεται είσοδο από θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες και οδηγεί στη φωσφορυλίωση της κινάσης AKT στη θέση Thr308. Η AKT φωσφορυλιώνεται επίσης στη θέση Ser473 από το mTORC2, κάτι που περαιτέρω ενεργοποιεί την AKT. Το mTORC2 ρυθμίζεται θετικά από το σύμπλοκο της οζώδους σκλήρυνσης (TSC1/TSC2 complex) και δέχεται είσοδο από αυξητικούς παράγοντες. Παρόλα αυτά υπάρχουν θέσεις που φωσφορυλιώνονται από το mTORC2 που δε εξαρτώνται από αυξητικούς παράγοντες.[173] Αν και η AKT θεωρείται πλήρως ενεργοποιημένη όταν είναι διπλά φωσφορυλιωμένη, έχει παρατηρηθεί ότι η φωσφορυλίωση στη θέση Ser473

δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του mTORC1.[167] Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η φωσφορυλιωμένη AKT στη θέση Ser473 δεν αντανakλά το βαθμό ενεργοποίησης του mTORC2, αλλά μάλλον το βαθμό ενεργότητας της PI3K.[173] Η AMPK αποτελεί αισθητήρα για την έλλειψη γλυκόζης στο κύτταρα και εν συνεχεία καταστέλλει το mTORC1. Στη διαβητική νεφροπάθεια, το mTORC1 είναι ενεργοποιημένο, μέσω της AMPK, και οι σηματοδοτικοί στόχοι που βρίσκονται στην κατωφέρεια του, συντελούν στην παθογένεση της βλάβης.[167]

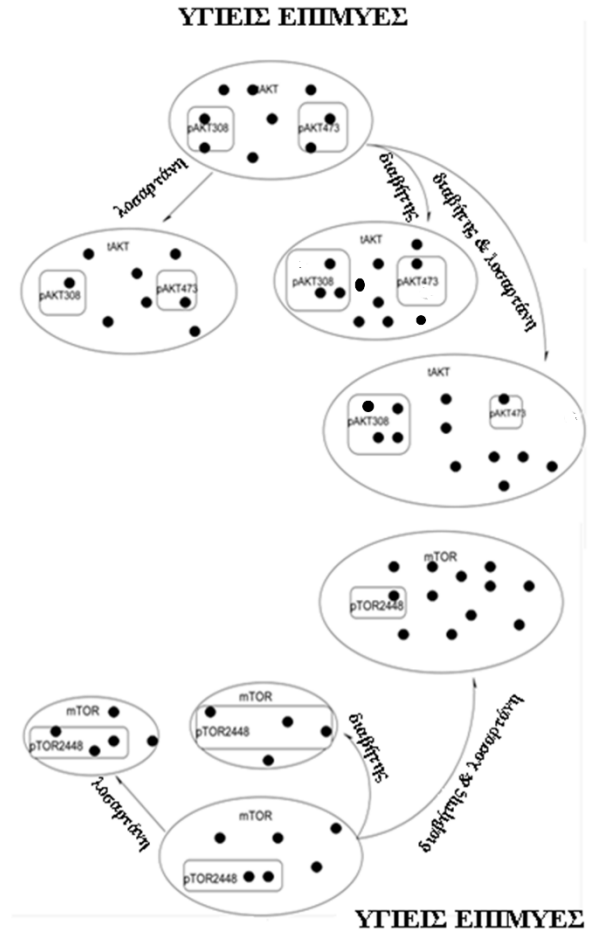
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διενεργήθηκαν στα πλαίσια της παρούσης διατριβής, δείχνουν ότι ο σακχαρώδης διαβήτης αύξησε την pAKT308, mTOR και pTOR2448 σε επίπεδο σπειράματος. Αυτά τα πορίσματα είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα από προηγούμενες μελέτες. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η mTOR και οι σηματοδοτικοί της στόχοι είναι ενεργοποιημένοι σε ένα πειραματικό μοντέλο διαβητικής νεφροπάθειας.[213] Επιπλέον, έχει βρεθεί αυξημένη πρωτεϊνική AKT και mTOR σε διαβητικά πειραματόζωα, κάτι το οποίο εμπλέκεται στη νεφρική βλάβη.[208, 209] Τα ανωτέρω πορίσματα ανεδείχθησαν με τη χρήση του ειδικού αναστολέα mTOR, ραπαμυκίνη, που αντέστρεψε τις προκαλούμενες από το σακχαρώδη διαβήτη παθολογοανατομικές αλλοιώσεις. Επιπροσθέτως, υπάρχουν δεδομένα από Western Blot ότι η AKT, η κινάση p70S6 και η πρωτεΐνη 4E-BP-1 είναι φωσφορυλιωμένες σε σπειράματα διαβητικών αρουραίων. Παράλληλα, παρατηρείτο σπειραματική και μεσαγγειακή υπερτροφία. Ανοσοϊστοχημικά διαπιστώθηκε ότι η ενεργοποιημένη AKT εντοπιζόταν στο μεσάγγειο.[210]

Στην παρούσα μελέτη, τα σπειράματα των διαβητικών πειραματόζωων υπό λοσαρτάνη, παρουσίαζαν μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση mTOR, pTOR2448, pAKT308 και pAKT473, αλλά αυξημένα επίπεδα AKT. Είναι προφανές ότι η λοσαρτάνη στα διαβητικά πειραματόζωα ανέστρεψε τη σηματοδότηση που οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού AKT /mTOR (Εικ 8).

## ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΑ



## ΠΟΔΟΚΥΤΤΑΡΑ



**Εικόνα 18** Συνολική παρουσίαση των αλλαγών που προκαλούνται από τη λοσαρτάνη σε επίπεδο σπειράματος (αριστερά) και σε επίπεδο ποδοκυττάρων (δεξιά). Οι ελλειπτικές περιοχές αντιπροσωπεύουν ολικά επίπεδα πρωτεϊνών (tAKT, mTOR) σε διαφορετικές συνθήκες (λοσαρτάνη, διαβήτης, διαβήτης και λοσαρτάνη) σε σπείραμα και ποδοκύτταρα. Οι περιοχές των τετραγώνων μέσα στις ελλείψεις αντιπροσωπεύουν τις φωσφορυλιωμένες μορφές (pAKT308, pAKT473, pTOR2448) σε διαφορετικές συνθήκες στα σπειράματα ή τα ποδοκύτταρα. Οι μαύροι κύκλοι (•) αντιπροσωπεύουν τα μόρια των πρωτεϊνών.

Ο ειδικός ποδοκυτταρικός δείκτης νεφρίνη χρησιμοποιήθηκε για τη διενέργεια των πειραμάτων συνεντόπισης με τις υπό μελέτη πρωτεΐνες. Η νεφρίνη διαθέτει ένα εξωκυττάριο τμήμα το οποίο συμμετέχει στη διάρθρωση του σχισμοειδούς διαφράγματος, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα το οποίο συμμετέχει στην οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού αλλά και στη διαμεσολάβηση σηματοδότησης μέσα στο ποδοκύτταρο.[10] Συγκεκριμένα έχει

διαπιστωθεί ότι το ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης αλληλεπιδρά με την PI3K και ρυθμίζει τον καταρράκτη PI3K-AKT-mTOR σε επίπεδο σχισμοειδούς διαφράγματος.[231] Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ανοσοφθορισμού και Western Blot αναγνωρίζει έναν επίτοπο στο ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης. Από την άλλη πλευρά, σε πειραματικά μοντέλα διαβητικής νεφροπάθειας, η νεφρίνη έχει βρεθεί να εντοπίζεται σε άλλες θέσεις εντός του ποδοκυττάρου, εκτός από τις ποδοκυτταρικές προσεκβολές.[232] Στο παρόν μοντέλο δε διαπιστώθηκε διαφορά στα ολικά επίπεδα της πρωτεΐνης μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων. Επιπλέον, τα πειραματικά δεδομένα που αφορούν το ποσό της νεφρίνης σε επίπεδο πρωτεΐνης, στη διαβητική νεφροπάθεια, είναι αντικρουόμενα. Σε πειραματικά μοντέλα σακχαρώδους διαβήτη τύπου I διαπιστώθηκε μείωση της έκφρασης της νεφρίνης σε επίπεδο πρωτεΐνης, όπως επίσης και μείωση του mRNA της νεφρίνης σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες[129, 233] Μείωση των επιπέδων της νεφρίνης στο σπείραμα διαπιστώθηκε με ανοσοφθορισμό και Western Blot σε ποντίκια db/db.[234]

Σε ένα μοντέλο υπέρτασης και διαβήτη, ο συνδυασμός περινδοπρίλης και αμινογουανιδίνης αποκατέστησε την απώλεια της νεφρίνης στο σπείραμα.[235] Σε μελέτες ασθενών με διαβήτη τύπου I και διαβήτη τύπου II, διαπιστώθηκε μείωση της έκφρασης της νεφρίνης σε επίπεδο πρωτεΐνης και γονιδίου όπως επίσης και αλλαγή της εντόπισης της σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.[19, 236, 237]

Σε αντίθεση με τα ευρήματα των ανωτέρω μελετών, έρχεται η εργασία των Aaltonen P et al που έδειξε αύξηση των επιπέδων mRNA της νεφρίνης και αλλαγή στην εντόπιση της πρωτεΐνης σε δυο διαφορετικά μοντέλα διαβήτη, αυτό του επαγόμενου από στρεπτοζοτοκίνη και του NOD (non obese diabetic mouse)[238] Σε db/db ποντίκια διαπιστώθηκε αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της νεφρίνης με τη μέθοδο του Western blot.[239]

Επίσης, σε πειραματικά μοντέλα διαβήτη έχει περιγραφεί να αυξάνεται η νεφρίνη κατά τις πρώτες 8 εβδομάδες της νόσου.[240]

Η αιτία για τις παραπάνω αποκλίσεις δεν είναι διασαφηνισμένη. Πιθανώς να οφείλονται σε διαφορές στα είδη, στη διάρκεια του διαβήτη και στο ενδεχόμενο συνύπαρξης

υπέρτασης. Οι Kim JJ et al εξέτασαν μικρά και μεγάλα σπειράματα από διαβητικά πειραματόζωα και παρατήρησαν συσχέτιση των επιπέδων πρωτεΐνης της νεφρίνης με το μέγεθος των σπειραμάτων.[241]

Στα ποδοκύτταρα, παρατηρήθηκε ότι ο σακχαρώδης διαβήτης προκάλεσε αύξηση στην ολική AKT, pAKT308 και pTOR2448, κάτι που υποδεικνύει ενεργοποίηση του μονοπατιού, παρά τη μείωση των mTOR και pAKT473. Η χορήγηση της λοσαρτάνης στα διαβητικά πειραματόζωα, παρόλο που αύξησε τα επίπεδα ποδοκυτταρικής mTOR, μείωσε την ενεργοποιημένη μορφή της, όπως προκύπτει από τη μειωμένη pTOR2448. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην έκφραση της AKT και pAKT473 στα ποδοκύτταρα ως συνέπεια της χορήγησης της λοσαρτάνης στα διαβητικά πειραματόζωα. Οι διαφορές που διαπιστώθηκαν στις πρωτεΐνες στο επίπεδο του σπειράματος και των ποδοκυττάρων πιθανώς αντιπροσωπεύουν έναν διαφορετικό τρόπο ρύθμισης της σηματοδότησης σε ξεχωριστά τμήματα του σπειράματος. Εφόσον το σπείραμα αποτελείται από τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων, οι ανωτέρω παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις, είναι δυνατόν να αποδοθούν σε διαφορετική επίδραση του διαβήτη και/ή της λοσαρτάνης σε αυτούς τους κυτταρικούς πληθυσμούς. Στην παρούσα διατριβή, υπάρχει συνάφεια ανάμεσα στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο ξεχωριστές πειραματικές προσεγγίσεις, ανοσοφθορισμό και Western Blot, κάτι που ισχυροποιεί τα δεδομένα ακόμα περισσότερο.

Η ενεργοποίηση του mTORC1 είναι καθοριστικό γεγονός στην παθογένεση της διαβητικής νεφροπάθειας.[242] Σε διαβητικούς μύες η γενετική απαλειφή του raptor, μόνο στα ποδοκύτταρα, άσκησε προστατευτικό ρόλο και πρόλαβε την πρόοδο της νεφρικής βλάβης. Είναι ενδιαφέρον πως στα ποδοκύτταρα των CtrlRx αρουραίων, η pTOR2448 ήταν αυξημένη σε σχέση με τους Ctrl αρουραίους. Αντιθέτως, στην ομάδα των DmRx, η pTOR2448 ήταν μειωμένη εν συγκρίσει με την ομάδα των Dm. Αυτές οι διαφορές υποδηλώνουν διαφορετική επίδραση της λοσαρτάνης στα ποδοκύτταρα παρουσία ή όχι του σακχαρώδη διαβήτη. Επιπλέον, αυτού του είδους οι διαφορές ήταν μικρότερης κλίμακας στα υγιή πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη σε σχέση με τα θεραπευμένα διαβητικά, επειδή το περιεχόμενο των υπό μελέτη πρωτεϊνών στα

ποδοκύτταρα ήταν λιγότερο στους μη διαβητικούς αρουραίους. Παρόμοια συμπεράσματα εξάγονται σε ό,τι αφορά τα σπειράματα των πειραματοζώων χωρίς διαβήτη.

Αναφορικά με τα κλινικά και βιοχημικά αποτελέσματα, παρατηρήθηκε μείωση στην απέκκριση της λευκωματίνης στους διαβητικούς επίμυες υπό λοσαρτάνη. Επιπροσθέτως, η λοσαρτάνη δεν είχε καμία επίδραση στην αρτηριακή πίεση των διαβητικών πειραματοζώων. Αυτό το εύρημα, σε συνδυασμό με τη μείωση της λευκωματινουρίας και τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού υποδεικνύουν απευθείας δράσεις της λοσαρτάνης στον ιστό, ανεξάρτητα από την επίδρασή της στην αιμοδυναμική ισορροπία του σπειράματος.

Σε ό,τι αφορά την επίδραση του σακχαρώδη διαβήτη στο πάχος της βασικής μεμβράνης του σπειράματος (BM), διαπιστώθηκε αύξηση του πάχους της, αποτέλεσμα συμβατό με την υπόλοιπη βιβλιογραφία. Η λοσαρτάνη, στο παρόν πειραματικό μοντέλο αποκατέστησε το πάχος της BM στα επίπεδα των υγιών πειραματοζώων. Τα ευρήματα στη διεθνή βιβλιογραφία σε ό,τι αφορά την επίδραση της λοσαρτάνης στο πάχος της BM είναι αντικρουόμενα. Συγκεκριμένα, σε διαβητικούς επίμυες Wistar, παρατηρήθηκε μείωση του πάχους της βασικής μεμβράνης του σπειράματος μετά από χορήγηση λοσαρτάνης, σε σχέση με αντίστοιχους διαβητικούς μάρτυρες.[243] Αντίθετα, σε μια άλλη μελέτη σε διαβητικούς μύες, η λοσαρτάνη δεν επανέφερε το πάχος της βασικής μεμβράνης στα φυσιολογικά επίπεδα.[244] Αυτές οι διακυμάνσεις πιθανώς οφείλονται σε διαφορές στην επαγωγή του σακχαρώδους διαβήτη, στη διάρκεια του διαβήτη και τη διάρκεια χορήγησης της λοσαρτάνης.

Τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής παρέχουν επαρκή απόδειξη, ότι υπάρχει διαφορική ρύθμιση στη σηματοδότηση AKT-mTOR στα ποδοκύτταρα και τα υπόλοιπα κυτταρικά διαμερίσματα του σπειράματος ως συνέπεια του σακχαρώδους διαβήτη και της λοσαρτάνης. Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT-mTOR εμπλέκεται στην παθογένεση της νεφρικής βλάβης στη διαβητική νεφροπάθεια, μέσω της παραγωγής εξωκυττάριας ουσίας και της υπερτροφίας των κυττάρων. Η λοσαρτάνη άσκησε ευεργετική επίδραση στην έκφραση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο

σηματοδοτικό καταρράκτη, υποδηλώνοντας επικοινωνία του συστήματος ρενίνης αγγειοτασίνης και του PI3K-AKT-mTOR.

### **Γ.ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ΕΛΛΗΝΙΚΗ)**

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I αποτελεί μια από τις πιο συχνές παθήσεις που πλήττουν την παιδική ηλικία παγκοσμίως. Η υπεργλυκαιμία, που προκύπτει από την καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος, αποτελεί το εναρκτήριο ερέθισμα για μια



σειρά από επιπλοκές, που πλήττουν όργανα- στόχους μεταξύ αυτών και ο νεφρός. Η πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα του νεφρού δεν εξαρτάται από την ινσουλίνη, αντίθετα η γλυκόζη διαχέεται σύμφωνα με το πρηνές της συγκέντρωσης, με τα ενδοκυττάρια επίπεδα γλυκόζης να αυξάνονται αναλόγως με το βαθμό της υπεργλυκαιμίας. Μια σειρά από μεταβολικές αλλαγές και αιμοδυναμικό stress επάγουν την έκκριση κυττοκινών και αυξητικών παραγόντων που τελικά διαμεσολαβούν τη νεφρική βλάβη στο σακχαρώδη διαβήτη, όπως αυτή εκδηλώνεται με την υπερτροφία των κυττάρων του νεφρού, την εναπόθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τη βλάβη του ποδοκυττάρου. Καθώς η πάθηση εξελίσσεται, η απέκκριση της λευκωματίνης στα ούρα αυξάνεται.

Το Σύστημα Ρενίνης Αγγειοτασίνης (ΣΡΑ) διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της διαβητικής νεφροπάθειας. Στη διαβητική νεφροπάθεια, το συστηματικό ΣΡΑ είναι κατεσταλμένο ενώ το ενδονεφρικό είναι ενεργοποιημένο και εμπλέκεται στην παθογένεση της νεφρικής βλάβης όπως έχει διαπιστωθεί τόσο σε πειραματικά μοντέλα διαβήτη όσο και σε βιοψίες νεφρού ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια. Σε σπειράματα πειραματοζώων με σακχαρώδη διαβήτη, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα αγγειοτασινογόνου και αγγειοτασίνης II σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Μάλιστα, η εξωγενής χορήγηση αγγειοτασίνης I στα σπειράματα, οδηγούσε σε αυξημένη σύνθεση αγγειοτασίνης II, στα σπειράματα των διαβητικών πειραματοζώων. Σε βιοψίες νεφρού ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια, έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση του μετατρεπτικού ενζύμου σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Επιπλέον, το σπείραμα και συγκεκριμένα το ποδοκύτταρο κατέχουν κεντρική θέση στην παθοφυσιολογία της διαβητικής νεφροπάθειας.

Πειραματικά δεδομένα από κυτταροκαλλιέργειες, συνδέουν την αγγειοτασίνη II με αυξημένη δραστηριότητα mTOR. Το μονοπάτι PI3K- AKT- mTOR εμπλέκεται στην ανάπτυξη νεφρικής βλάβης στο σακχαρώδη διαβήτη. Έχει βρεθεί ότι η AKT και η mTOR είναι ενεργοποιημένες στη διαβητική νεφροπάθεια, διαμεσολαβώντας τις παθολογοανατομικές βλάβες. Η mTOR, μια κινάση σερίνης-θρεονίνης, αποτελεί

συνιστώσα 2 ξεχωριστών πολυπρωτεϊνικών σηματοδοτικών συμπλεγμάτων (mTORC1, mTORC2). Αυξητικοί παράγοντες και αμινοξέα ενεργοποιούν την κινάση των φωσφοινοσιτιδίων-3-OH (PI3K) που φωσφορυλιώνει την PIP2 προς PIP3, που, εν συνεχεία, ενεργοποιεί την PDK1. Η PDK1 ενεργοποιεί την AKT, μέσω φωσφορυλίωσης στην θέση Thr308 (pAKT308). Η AKT είναι βασικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης και της αύξησης των κυττάρων. Η ενεργοποιημένη AKT οδηγεί σε ενεργοποίηση του mTORC1, αίροντας μια σειρά από ανασταλτικά σήματα, μέσω του συστήματος της οζώδους σκλήρυνσης (tuberous sclerosis system –TSC complex). Η AKT μπορεί, επίσης, να ενεργοποιήσει απευθείας το mTORC1, φωσφορυλιώνοντας την mTOR στη θέση Ser2448 (pTOR2448), χωρίς να παρεμβληθεί το σύμπλοκο της οζώδους σκλήρυνσης. Η AMPK ενεργοποιείται σε συνθήκες χαμηλών επιπέδων γλυκόζης και καταστέλλει το mTORC1, και επομένως εξασφαλίζει ότι, σε συνθήκες έλλειψης ενέργειας, ενεργοβόρες διεργασίες μέσα στο κύτταρο αναστέλλονται. Επιπλέον, το mTORC2 φωσφορυλιώνει την AKT στην θέση Ser473 (pAKT473).

Μέχρι τώρα, δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία δεδομένα σχετικά με την επίδραση της αντιπρωτεϊνουρικής θεραπείας λοσαρτάνης στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K- AKT- mTOR σε ένα in vivo μοντέλο διαβητικής νεφροπάθειας τύπου I. Επομένως, σε ένα πειραματικό μοντέλο διαβητικής νεφροπάθειας τύπου I μετά από χορήγηση λοσαρτάνης, διερευνήθηκαν τα εξής:

A) Το περιεχόμενο της ολικής AKT, pAKT308, pAKT473, mTOR και pTOR2448, στο σπείραμα.

B) Το περιεχόμενο ολικής AKT, pAKT308, pAKT473, mTOR και pTOR2448 στο επίπεδο του ποδοκυττάρου, πραγματοποιώντας πειράματα συνεντόπισης με τον ειδικό ποδοκυτταρικό δείκτη νεφρίνη.

Γ) Το πάχος της βασικής μεμβράνης του σπειράματος και η έκταση του μεσαγγείου

Δ) Κλινικές και βιοχημικές παράμετροι των πειραματοζώων όπως είναι η συστολική αρτηριακή πίεση και η απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα 24ώρου.

Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να διερευνηθούν τα ανωτέρω ερωτήματα, αρουραίοι Sprague-Dawley έγιναν διαβητικοί με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση

στρεπτοζοτοκίνης. Τρεις ημέρες μετά τη χορήγηση της στρεπτοζοτοκίνης, έγινε μέτρηση γλυκόζης αίματος και τα πειραματόζωα με γλυκόζη αίματος >350mg/dl, συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Στα διαβητικά πειραματόζωα χορηγείτο κάθε δεύτερη μέρα ινσουλίνη glargine, υποδορίως, σε δόση εξατομικευμένη με στόχο γλυκόζη αίματος μεταξύ 350 έως 500 mg/dl. Μια φορά το μήνα, τα πειραματόζωα τοποθετούνταν σε ειδικούς μεταβολικούς κλωβούς, με σκοπό τη συλλογή ούρων 24ώρου. Κατά τη διάρκεια της συλλογής, οι αρουραίοι είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Τα ούρα που συλλέγονταν προορίζονταν για τη μέτρηση της λευκωματίνης. Πέντε μήνες μετά την επαγωγή του σακχαρώδους διαβήτη, τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 4 ομάδες: διαβητικά πειραματόζωα, διαβητικά πειραματόζωα υπό λοσαρτάνη διαλυμένη στο πόσιμο νερό, υγιείς μάρτυρες και υγιείς μάρτυρες υπό λοσαρτάνη διαλυμένη στο πόσιμο νερό. Δύο μήνες μετά την έναρξη της χορήγησης της λοσαρτάνης τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε ειδικούς μεταβολικούς κλωβούς για συλλογή ούρων 24ώρου με σκοπό τη μέτρηση της απέκκρισης της λευκωματίνης. Επίσης, έγινε μέτρηση της συστολικής πίεσης αφού είχε γίνει ο απαραίτητος εγκλιματισμός των πειραματοζώων στο σύστημα μέτρησης της αρτηριακής πίεσης. Μετά, διενεργήθηκε ευθανασία με χορήγηση νατριούχου πεντοβαρβιτάλης και τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με αφαιμάξη. Οι νεφροί απομονώθηκαν και αφού ζυγίσθηκαν, τμήματα αυτών υπέστησαν διαφορετική επεξεργασία με σκοπό τη διενέργεια διαφορετικών τεχνικών. Ένα τμήμα αυτών χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση σπειραμάτων με τη μέθοδο των διαδοχικών ηθμών διαφορετικής διαμέτρου πόρου. Συγκεκριμένα, αφού ο νεφρικός φλοιός πολτοποιήθηκε, διηθήθη πρώτα από το φίλτρο των 150μm, πάνω στο οποίο συγκρατήθηκαν αγγεία και σωληνάκια και διήλθε το υλικό που περιείχε τα σπειράματα. Εν συνεχεία, στο φίλτρο των 106μm, ο ιστός που συγκεντρώθηκε υπέστη εκτεταμένες πλύσεις με αποτέλεσμα να διέλθουν τα σπειράματα. Στο φίλτρο των 106μm, ο ιστός που παρέμεινε ήταν σωληναριακός. Τέλος, στο φίλτρο των 75μm, τα σπειράματα που συλλέχθηκαν υπέστησαν πλύσεις με φυσιολογικό ορό, ώστε να απορριφθούν μικρά τμήματα σωληναρίων. Αφού, ελέγχθηκε, στο οπτικό μικροσκόπιο, η καθαρότητα του

σπειραματικού υλικού και διαπιστώθηκε πως αυτή ήταν >95%, αυτό τοποθετήθηκε σε διάλυμα λύσης με σκοπό τη μελέτη του, με τη μέθοδο ανοσοστυπώματος κατά Western (Western blot). Για τη Western blot, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πρωτογενή αντισώματα Akt pAb, Ser473 pAkt mAb, Thr308 pAkt mAb και τα αντίστοιχα δευτερογενή αντισώματα. Επίσης, τμήμα των νεφρών εμβαπτίσθηκε ταχέως σε υγρό άζωτο και μετά φυλάχθηκε στους -800C μέχρι να διενεργηθεί ο έμμεσος ανοσοφθορισμός. Για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή αντισώματα έναντι της ολικής AKT, pAKT308, pAKT473, mTOR, pTOR2448 και νεφρίνης και τα αντίστοιχα δευτερογενή αντισώματα. Το τεμάχιο του νεφρού που προοριζόταν για πειράματα φωτομικροσκοπίας και εκτίμηση της έκτασης του μεσαγγείου εμβαπτίσθηκε σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10%. Τέλος, το τμήμα του νεφρού που προοριζόταν για μελέτη με ηλεκτρονική μικροσκοπία και μέτρηση του πάχους της βασικής μεμβράνης όλων των ανοικτών αγκυλών τριχοειδών των σπειραμάτων εμβαπτιζόταν σε διάλυμα γλουταραλδεϋδης 5% v/v σε 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων.

Από την ανωτέρω μελέτη, σε ό,τι αφορά τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους των πειραματοζώων, προέκυψαν τα εξής: Παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της απέκκρισης λευκωματίνης ανά 24ωρο στα ούρα των διαβητικών πειραματοζώων από την επαγωγή του σακχαρώδους διαβήτη μέχρι τον 5ο μήνα της παρακολούθησής τους. Η χορήγηση λοσαρτάνης προκάλεσε μείωση της λευκωματινουρίας στα διαβητικά πειραματόζωα. Σε σχέση με τη μέτρηση της αρτηριακής πίεσης των πειραματοζώων, διαπιστώθηκε ότι ο σακχαρώδης διαβήτης προκάλεσε αύξηση στη συστολική αρτηριακή πίεση, ενώ η λοσαρτάνη δεν είχε καμία επίδραση στη συστολική αρτηριακή πίεση των διαβητικών πειραματοζώων κάτι το οποίο υποδεικνύει ότι οι ευεργετικές επιδράσεις της λοσαρτάνης στο διαβήτη δεν είναι μόνο συνέπεια της επίδρασης της στην αιμοδυναμική ισορροπία του σπειράματος.

Σε ό,τι αφορά την εκτίμηση της έκτασης του μεσαγγείου, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του μεσαγγείου, στα διαβητικά πειραματόζωα σε σχέση με τα υγιή. Ως συνέπεια της επίδρασης της λοσαρτάνης στα διαβητικά πειραματόζωα,

διαπιστώθηκε τάση για μείωση της έκτασης του μεσαγγείου χωρίς να προκύψει στατιστική σημαντικότητα.

Η λοσαρτάνη μείωσε την, προκαλούμενη από το σακχαρώδη διαβήτη, πάχυνση της βασικής μεμβράνης του σπειράματος.

Σε ό,τι αφορά τα πειράματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού, επώασθηκαν κρυοτομές νεφρικού ιστού με πρωτογενή αντισώματα έναντι της ολικής AKT, pAKT308, pAKT473, mTOR, pTOR2448 και νεφρίνης. Διαπιστώθηκε ότι σε επίπεδο σπειράματος, ο σακχαρώδης διαβήτης προκάλεσε αύξηση των pAKT308, mTOR και pTOR2448, ευρήματα σε ευθυγράμμιση με την υπόλοιπη βιβλιογραφία. Η χορήγηση λοσαρτάνης στα διαβητικά πειραματόζωα προκάλεσε μείωση της mTOR, pTOR2448 και των ενεργοποιημένων μορφών της AKT, pAKT308 και pAKT473, ενώ αύξησε τα επίπεδα της ολικής AKT. Είναι προφανές πως η λοσαρτάνη στα διαβητικά πειραματόζωα αντέστρεψε τη σηματοδότηση που οδηγούσε σε ενεργοποίηση της AKT και της mTOR.

Ο ειδικός ποδοκυτταρικός δείκτης νεφρίνη χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα συνεντόπισης με τα ανωτέρω υπό μελέτη μόρια. Σε επίπεδο ποδοκυττάρου, παρατηρήθηκε ότι ο σακχαρώδης διαβήτης προκάλεσε αύξηση στην ολική AKT, pAKT308 και pTOR2448, κάτι που υποδεικνύει ενεργοποίηση του μονοπατιού παρά τη μείωση της mTOR και της pAKT473. Η λοσαρτάνη στα διαβητικά πειραματόζωα, παρά την αύξηση της ποδοκυτταρικής mTOR, ουσιαστικά μείωσε το βαθμό ενεργοποίησής της, όπως αυτό τεκμηριώνεται από τη μείωση της pTOR2448. Τα επίπεδα της ολικής AKT και pAKT473, στα ποδοκύτταρα των διαβητικών πειραματοζώων, δεν άλλαξαν ως συνέπεια της χορήγησης λοσαρτάνης. Στα ποδοκύτταρα των υγιών πειραματοζώων υπό λοσαρτάνη παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της pTOR2448 σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, το αντίθετο από ότι διαπιστώθηκε για τις ομάδες των διαβητικών επίμυων. Αυτό υποδεικνύει διαφορετική δράση της λοσαρτάνης στα ποδοκύτταρα, ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι σακχαρώδους διαβήτη. Οι διαφορές που διαπιστώθηκαν στις πρωτείνες στο επίπεδο του σπειράματος και των ποδοκυττάρων πιθανώς αντιπροσωπεύουν έναν διαφορετικό τρόπο ρύθμισης της σηματοδότησης σε ξεχωριστά

τμήματα του σπειράματος. Εφόσον το σπείραμα αποτελείται από τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων οι ανωτέρω παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις, είναι δυνατόν να αποδοθούν σε διαφορετική επίδραση του διαβήτη και/ή της λοσαρτάνης σε αυτούς τους κυτταρικούς πληθυσμούς.

Τα αποτελέσματα της Western blot επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού, κάτι που ισχυροποιεί τα δεδομένα ακόμα περισσότερο.

Συμπερασματικά, η λοσαρτάνη μείωσε την απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα 24ώρου, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στην αρτηριακή πίεση των διαβητικών πειραματοζώων.

Παράλληλα, σε ό,τι αφορά τη βασική μεμβράνη του σπειράματος, η λοσαρτάνη αντέστρεψε την, προκαλούμενη από το σακχαρώδη διαβήτη, πάχυνσή της. Αναφορικά με το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K- AKT- mTOR, διαπιστώθηκε διαφορετική ρύθμιση της ενεργοποίησής του σε σπειράματα και ποδοκύτταρα ως συνέπεια της επίδρασης του σακχαρώδους διαβήτη και της λοσαρτάνης. Το μονοπάτι PI3K- AKT- mTOR εμπλέκεται στην παθογένεση της νεφρικής βλάβης στο διαβήτη, μέσω πρόκλησης υπερτροφίας των κυττάρων και παραγωγής εξωκυττάριας ουσίας. Η λοσαρτάνη επηρεάζει τα επίπεδα των πρωτεϊνών του με ευεργετικό τρόπο, υποδηλώνοντας διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ του συστήματος ρενίνης αγγειοτασίνης και του μονοπατιού PI3K- AKT- mTOR.

#### **Δ.ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ΑΓΓΛΙΚΗ)**

Type 1 diabetes mellitus is an autoimmune disease, one of the most common in childhood worldwide. Pancreatic beta cells are destroyed and the resulting hyperglycemia is the trigger to a wide array of complications that affect target- organs,

including the kidney. Renal cells do not depend on insulin for glucose uptake, but instead glucose diffuses across the cell membrane down its concentration gradient. In diabetes, renal intracellular glucose levels rise in proportion to the degree of hyperglycemia. Metabolic changes and hemodynamic stress induce the release of cytokines and growth factors that ultimately mediate renal lesions in terms of renal cell hypertrophy, extracellular matrix deposition and podocyte abnormalities. As the disease progresses, the 24h urinary albumin excretion increases.

In diabetic nephropathy, despite the suppression of systemic renin angiotensin system (RAS), the renal renin angiotensin system is activated, causing detrimental effects in the kidney. Data from animal studies and human kidney biopsies provide sufficient evidence. In glomeruli from male Sprague- Dawley rats made diabetic by streptozotocin, there were detected increased levels of angiotensinogen and angiotensin II, as compared to their respective controls. In addition, exogenous administration of angiotensin I to the glomeruli resulted in an increase in angiotensin II production in diabetic glomeruli. In renal biopsies from diabetic patients with nephropathy, immunohistochemical studies showed enhanced angiotensin-converting enzyme (ACE) staining in glomeruli from diabetic patients, as opposed to their healthy controls, implicating increased ACE as one of the factors responsible for the activation of renal renin angiotensin system in diabetic nephropathy.

Furthermore, the glomerulus and the podocytes have a central role in the pathophysiology of diabetic nephropathy.

Evidence from cell culture systems link angiotensin II and increased mTOR activity. PI3K- AKT- mTOR pathway is activated and involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy, mediating pathologic changes. Both AKT and mTOR are activated in diabetic nephropathy, mediating diabetic kidney lesions. mTOR, a serine- threonine kinase, is a component of 2 multiprotein signaling complexes, mTOR complex-1 (mTORC1) and mTOR complex-2 (mTORC2). PI3K receives input from amino acids and growth factors and phosphorylates PIP2 to PIP3 that activates PDK1. PDK1 activates AKT, through phosphorylation at Thr308 (pAKT308). AKT is a key regulator

of cell proliferation and survival. Activated AKT leads to mTORC1 activation through reversion of a series of inhibitory signals that involve the tuberous sclerosis system – TSC complex. AKT can also activate directly mTORC1 without the involvement of TSC complex by phosphorylation at Ser2448 (pTOR2448). AMPK is a cellular energy sensor, that is activated at low energy states and inhibits mTOR, ensuring that in conditions of cellular energy depletion, energy-consuming reactions are inhibited. AKT is also phosphorylated at Ser473 by mTORC2 (pAKT473).

No data, currently exists as to the effects of losartan on the PI3K-AKT-mTOR pathway in type 1 diabetic nephropathy in vivo.

Therefore, the purpose of the present thesis, was to investigate, in an experimental model of type 1 diabetic nephropathy:

- (a) The glomerular content of total AKT (tAKT), phosphorylated (p)AKT Thr308, pAKT Ser473, mTOR, and activated mTOR phosphorylated at residue Ser2448 (pTOR2448),
- (b) The podocytic content of the aforementioned molecules, employing co-localization analysis with the podocyte-specific marker nephrin,
- (c) The degree of mesangial matrix expansion and glomerular basement membrane thickening,
- (d) Clinical and biochemical parameters of the animals, such as systolic blood pressure and 24h urinary albumin excretion.

Diabetes mellitus was induced to male Sprague-Dawley rats by intraperitoneal injection of streptozotocin. Three days after the induction of diabetes, blood glucose was measured by a glucometer and animals with values >350 mg/dl were included in the study. The diabetic rats received, subcutaneously, insulin glargine, every other day, individually adjusted, to ensure blood glucose levels between 350-500 mg/dl. Monthly, the animals were put in specific metabolic cages for 24h urine collection. During the collection, the rats had ad libitum access to water and standard rat feed. The collected urine was intended for measurement of albumin excretion. Five months after the induction of diabetes, the rats were divided in four study groups and the per os



administration of losartan commenced (Dm diabetic animals, DmRx diabetic animals on losartan potassium daily, Ctrl healthy control animals, CtrlRx and healthy control animals on losartan potassium daily). After 2 months of losartan administration, the animals were housed in specific metabolic cages for 24h urine collection and measurement of albumin excretion. Furthermore, measurements of the animals' blood pressure took place, after the rats had been habituated in specific warming chambers of the blood pressure system. Afterwards, the animals were injected with sodium pentobarbital and killed by exsanguination. The kidneys were excised and weighed and parts of the tissue were processed differently for diverse techniques. Part of the kidneys was used for glomeruli isolation, employing sequential sieving through stainless steel sieves of different pore size. The kidney cortex was dissected and it was forced, using a spatula, through the screen of 150 $\mu$ m. The tissue that remained on the 150 $\mu$ m sieve was mainly tubular and vascular elements and it was discarded. The material collected onto the next screen, i.e. the 106  $\mu$ m one, was extensively washed with normal saline. After the washes, the tissue remaining on the middle sieve, mostly tubular elements, was discarded and the glomeruli had already passed and collected on the last screen of 75 $\mu$ m. The glomeruli were, also, washed with normal saline so that small tubular parts had passed through. Purity of the glomerular isolate was estimated >95%. Isolated glomeruli were put in lysis buffer containing protease inhibitors for Western Blot analysis. The samples were electrophorized and transferred to nitrocellulose membranes that were blotted with the following primary antibodies: tAKT, pAKT308, pAKT473, mTOR, pTOR2448 and nephrin. Appropriate secondary antibodies were applied. Furthermore, for indirect immunofluorescence studies, tissue was snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80C till further analysis. The following primary antibodies were used: tAKT, pAKT308, pAKT473, mTOR, pTOR2448 and nephrin. Tissue was also processed appropriately for optical microscope studies (estimation of mesangial matrix expansion) and transmission electron microscope observation (measurement of the glomerular basement membrane width).

As far as the clinical and biochemical parameters of the animals are concerned, results are as following: From diabetes induction to the fifth month of experimentation, 24h albumin excretion increased in the urine of diabetic subjects. Losartan decreased urinary albumin excretion in diabetic animals. Diabetes mellitus caused an increase in systolic blood pressure. However, losartan did not cause any effect on blood pressure of diabetic animals, implying that the beneficial role of losartan on diabetic kidney, may not be, exclusively, due to its effects on glomerular hemodynamics.

As far as the effect of losartan on glomerular basement membrane thickening is concerned, in diabetic animals, the glomerular basement membrane width was restored to normal.

Diabetes mellitus caused an increase in the mesangium. Concerning the influence of losartan on mesangial matrix expansion, there was a tendency towards reduction that did not reach statistical significance.

Regarding the immunofluorescence experiments, the sections were incubated with the following primary antibodies: total AKT, pAKT308, pAKT473, mTOR, pTOR2448 and nephrin. Diabetes increased glomerular pAKT308, mTOR, and pTOR2448 protein content, findings that are in accordance with those from previous studies. In losartan treated animals, glomeruli showed decreased mTOR, pTOR2448, pAKT308 and pAKT473 but increased AKT protein levels. These data demonstrate that losartan reversed the signaling events that led to AKT and mTOR activation.

The podocyte- specific marker nephrin was used for colocalization experiments with the molecules under study. In podocytes, diabetes mellitus caused an increase in total AKT, pAKT308, and pTOR2448 protein levels, indicating activation of the PI3K-AKT-mTOR pathway, despite the decrease in mTOR and pAKT473 content. In diabetic animals, losartan administration, despite the increase in podocytic mTOR, decreased its activation as it is shown by the decreased of pTOR2448. In losartan- treated healthy animals the observed effect was reversed: podocytic pTOR2448 levels were increased as opposed to the respective levels in healthy control animals.

Immunofluorescence results were further confirmed by Western blot.

Conclusively, losartan decreased albuminuria in diabetic animals and reversed the effect of diabetes on the glomerular basement membrane width. However, it had no effect on the blood pressure of diabetic animals. Furthermore, there was a differential pattern of in situ activation of the PI3K-AKT-mTOR pathway in glomeruli and podocytes as a result of diabetes and losartan. The PI3K-AKT-mTOR pathway is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy through cell hypertrophy and extracellular matrix production. Losartan influences its components in a beneficial way, implying a crosstalk between the Renin Angiotensin System and the PI3K-AKT-mTOR pathway.

## E.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alpern RJ, Moe OW, Caplan M, *et al.* Seldin and Giebisch's the Kidney Physiology and Pathophysiology 1-2. 5th ed. San Diego: Academic Press Imprint Elsevier Science & Technology Books.; 2012.
2. Jennette JC, Heptinstall RH. *Heptinstall's pathology of the kidney*. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
3. Groffen AJ, Ruegg MA, Dijkman H, *et al.* Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. *J Histochem Cytochem* 1998;46(1):19-27.
4. Blumenthal A, Giebel J, Ummanni R, *et al.* Morphology and migration of podocytes are affected by CD151 levels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302(10):F1265-77.
5. Baleato RM, Guthrie PL, Gubler MC, *et al.* Deletion of CD151 results in a strain-dependent glomerular disease due to severe alterations of the glomerular basement membrane. *Am J Pathol* 2008;173(4):927-37.
6. Jarad G, Pippin JW, Shankland SJ, *et al.* Dystroglycan does not contribute significantly to kidney development or function, in health or after injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300(3):F811-20.
7. Raats CJ, van den Born J, Bakker MA, *et al.* Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am J Pathol* 2000;156(5):1749-65.
8. Regele HM, Filipovic E, Langer B, *et al.* Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(3):403-12.
9. Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, *et al.* Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 2001;108(2):289-301.
10. Patrakka J, Tryggvason K. Nephrin--a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med* 2007;13(9):396-403.
11. Furness PN, Hall LL, Shaw JA, *et al.* Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14(5):1234-7.
12. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, *et al.* Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 2001;158(5):1723-31.
13. Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, *et al.* Expression of nephrin in pediatric kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(2):289-96.
14. Hingorani SR, Finn LS, Kowalewska J, *et al.* Expression of nephrin in acquired forms of nephrotic syndrome in childhood. *Pediatr Nephrol* 2004;19(3):300-5.
15. Verma R, Kovari I, Soofi A, *et al.* Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest* 2006;116(5):1346-59.
16. Vollenbröcker B, George B, Wolfgart M, *et al.* mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296(2):F418-26.
17. Schwarz K, Simons M, Reiser J, *et al.* Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001;108(11):1621-9.
18. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, *et al.* Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(8):2063-71.
19. Benigni A, Gagliardini E, Tomasoni S, *et al.* Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2004;65(6):2193-200.
20. Shih NY, Li J, Karpitskii V, *et al.* Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999;286(5438):312-5.

21. Shih NY, Li J, Cotran R, *et al.* CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 2001;159(6):2303-8.
22. Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, *et al.* CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279(4):F785-92.
23. Gagliardini E, Benigni A, Tomasoni S, *et al.* Targeted downregulation of extracellular nephrin in human IgA nephropathy. *Am J Nephrol* 2003;23(4):277-86.
24. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 1990;111(3):1255-63.
25. Kawachi H, Kurihara H, Topham PS, *et al.* Slit diaphragm-reactive nephritogenic MAb 5-1-6 alters expression of ZO-1 in rat podocytes. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 2):F984-93.
26. Kawachi H, Koike H, Shimizu F. mAb 5-1-6 nephropathy and nephrin. *Microsc Res Tech* 2002;57(4):236-40.
27. Sellin L, Huber TB, Gerke P, *et al.* NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J* 2003;17(1):115-7.
28. Liu G, Kaw B, Kurfis J, *et al.* Nephl and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* 2003;112(2):209-21.
29. Reiser J, Kriz W, Kretzler M, *et al.* The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(1):1-8.
30. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, *et al.* FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* 2001;59(3):1003-12.
31. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003;24(3):261-71.
32. Gould AB, Green D. Kinetics of the human renin and human substrate reaction. *Cardiovasc Res* 1971;5(1):86-9.
33. Corvol P, Williams TA, Soubrier F. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzymol* 1995;248:283-305.
34. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, *et al.* Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 1999;104(7):R19-23.
35. Rozansky DJ, Cornwall T, Subramanya AR, *et al.* Aldosterone mediates activation of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter through an SGK1 and WNK4 signaling pathway. *J Clin Invest* 2009;119(9):2601-12.
36. Ruster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(11):2985-91.
37. Schweda F, Kurtz A. Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand* 2004;181(4):383-90.
38. Harrison-Bernard LM. The renal renin-angiotensin system. *Adv Physiol Educ* 2009;33(4):270-4.
39. Francois H, Coffman TM. Prostanoids and blood pressure: which way is up? *J Clin Invest* 2004;114(6):757-9.
40. Crowley SD, Coffman TM. Recent advances involving the renin-angiotensin system. *Exp Cell Res* 2012;318(9):1049-56.
41. Iwai N, Inagami T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* 1992;298(2-3):257-60.
42. Llorens-Cortes C, Greenberg B, Huang H, *et al.* Tissue expression and regulation of type 1 angiotensin II receptor subtypes by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Hypertension* 1994;24(5):538-48.
43. Lautrette A, Li S, Alili R, *et al.* Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nat Med* 2005;11(8):867-74.

44. Ruster C, Wolf G. Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(7):1189-99.
45. Gelosa P, Pignieri A, Fändriks L, *et al.* Stimulation of AT<sub>2</sub> receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *J Hypertens* 2009;27(12):2444-51.
46. Wenzel UO, Krebs C, Benndorf R. The angiotensin II type 2 receptor in renal disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2010;11(1):37-41.
47. Ruster C, Bondeva T, Franke S, *et al.* Angiotensin II upregulates RAGE expression on podocytes: role of AT<sub>2</sub> receptors. *Am J Nephrol* 2009;29(6):538-50.
48. Carey RM. Update on the role of the AT<sub>2</sub> receptor. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14(1):67-71.
49. McCarthy CA, Vinh A, Callaway JK, *et al.* Angiotensin AT<sub>2</sub> receptor stimulation causes neuroprotection in a conscious rat model of stroke. *Stroke* 2009;40(4):1482-9.
50. Kagami S. Involvement of glomerular renin-angiotensin system (RAS) activation in the development and progression of glomerular injury. *Clin Exp Nephrol* 2012;16(2):214-20.
51. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, *et al.* The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 2007;59(3):251-87.
52. Belova LA. Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry (Mosc)* 2000;65(12):1337-45.
53. Urata H, Boehm KD, Philip A, *et al.* Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest* 1993;91(4):1269-81.
54. Takai S, Jin D, Sakaguchi M, *et al.* Chymase-dependent angiotensin II formation in human vascular tissue. *Circulation* 1999;100(6):654-8.
55. Petrie MC, Padmanabhan N, McDonald JE, *et al.* Angiotensin converting enzyme (ACE) and non-ACE dependent angiotensin II generation in resistance arteries from patients with heart failure and coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(4):1056-61.
56. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000;87(5):E1-9.
57. Ferrario CM, Varagic J. The ANG-(1-7)/ACE2/mas axis in the regulation of nephron function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;298(6):F1297-305.
58. Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol* 2013;216(2):R1-R17.
59. Zhuo JL, Li XC. New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides* 2011;32(7):1551-65.
60. Pinheiro SV, Simões E Silva AC. Angiotensin converting enzyme 2, Angiotensin-(1-7), and receptor MAS axis in the kidney. *Int J Hypertens* 2012;2012:414128.
61. Zhang J, Noble NA, Border WA, *et al.* Infusion of angiotensin-(1-7) reduces glomerulosclerosis through counteracting angiotensin II in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;298(3):F579-88.
62. Esteban V, Heringer-Walther S, Sterner-Kock A, *et al.* Angiotensin-(1-7) and the G protein-coupled receptor MAS are key players in renal inflammation. *PLoS One* 2009;4(4):e5406.
63. Shao Y, He M, Zhou L, *et al.* Chronic angiotensin (1-7) injection accelerates STZ-induced diabetic renal injury. *Acta Pharmacol Sin* 2008;29(7):829-37.
64. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, *et al.* Evidence that the angiotensin IV (AT<sub>4</sub>) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 2001;276(52):48623-6.
65. Chai SY, Fernando R, Peck G, *et al.* The angiotensin IV/AT<sub>4</sub> receptor. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(21):2728-37.
66. Zhang H, Wada J, Hida K, *et al.* Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *J Biol Chem* 2001;276(20):17132-9.

67. Simões E Silva AC, Flynn JT. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2012;27(10):1835-45.
68. Ichihara A, Kobori H, Nishiyama A, *et al.* Renal renin-angiotensin system. *Contrib Nephrol* 2004;143:117-30.
69. Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, *et al.* Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension* 1999;34(6):1265-74.
70. Rohrwasser A, Ishigami T, Gociman B, *et al.* Renin and kallikrein in connecting tubule of mouse. *Kidney Int* 2003;64(6):2155-62.
71. Metzger R, Bohle RM, Pauls K, *et al.* Angiotensin-converting enzyme in non-neoplastic kidney diseases. *Kidney Int* 1999;56(4):1442-54.
72. Casarini DE, Boim MA, Stella RC, *et al.* Angiotensin I-converting enzyme activity in tubular fluid along the rat nephron. *Am J Physiol* 1997;272(3 Pt 2):F405-9.
73. Kobori H, Nishiyama A, Harrison-Bernard LM, *et al.* Urinary angiotensinogen as an indicator of intrarenal Angiotensin status in hypertension. *Hypertension* 2003;41(1):42-9.
74. Ding Y, Davisson RL, Hardy DO, *et al.* The kidney androgen-regulated protein promoter confers renal proximal tubule cell-specific and highly androgen-responsive expression on the human angiotensinogen gene in transgenic mice. *J Biol Chem* 1997;272(44):28142-8.
75. Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Expression of angiotensinogen mRNA and protein in angiotensin II-dependent hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(3):431-9.
76. Miyata N, Park F, Li XF, *et al.* Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 2):F437-46.
77. Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, *et al.* Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol* 1997;273(1 Pt 2):F170-7.
78. Norwood VF, Garmey M, Wolford J, *et al.* Novel expression and regulation of the renin-angiotensin system in metanephric organ culture. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279(2):R522-30.
79. Navar LG, Mitchell KD, Harrison-Bernard LM, *et al.* Intrarenal angiotensin II levels in normal and hypertensive states. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2001;2:S176-S184.
80. Navar LG, Imig JD, Zou L, *et al.* Intrarenal production of angiotensin II. *Semin Nephrol* 1997;17(5):412-22.
81. Danser AH, Admiraal PJ, Derkx FH, *et al.* Angiotensin I-to-II conversion in the human renal vascular bed. *J Hypertens* 1998;16(12 Pt 2):2051-6.
82. Reams G, Villarreal D, Bauer JH. Intrarenal metabolism of angiotensin II. *Am J Physiol* 1990;258(6 Pt 2):F1510-5.
83. Seikaly MG, Arant BS, Seney FD. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest* 1990;86(4):1352-7.
84. Siragy HM, Howell NL, Ragsdale NV, *et al.* Renal interstitial fluid angiotensin. Modulation by anesthesia, epinephrine, sodium depletion, and renin inhibition. *Hypertension* 1995;25(5):1021-4.
85. Braam B, Mitchell KD, Fox J, *et al.* Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats. *Am J Physiol* 1993;264(5 Pt 2):F891-8.
86. Navar LG, Lewis L, Hymel A, *et al.* Tubular fluid concentrations and kidney contents of angiotensins I and II in anesthetized rats. *J Am Soc Nephrol* 1994;5(4):1153-8.
87. Faubert PF, Chou SY, Porush JG. Regulation of papillary plasma flow by angiotensin II. *Kidney Int* 1987;32(4):472-8.
88. Mendelsohn FA, Dunbar M, Allen A, *et al.* Angiotensin II receptors in the kidney. *Fed Proc* 1986;45(5):1420-5.
89. Kumar R, Thomas CM, Yong QC, *et al.* The intracrine renin-angiotensin system. *Clin Sci (Lond)* 2012;123(5):273-84.

90. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 1983;32 Suppl 2:64-78.
91. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. *N Engl J Med* 2000;342(6):381-9.
92. Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 1984;311(2):89-93.
93. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(5):1358-73.
94. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003;83(1):253-307.
95. Kolset SO, Reinholt FP, Jenssen T. Diabetic nephropathy and extracellular matrix. *J Histochem Cytochem* 2012;60(12):976-86.
96. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005;54(6):1626-34.
97. Inoue S, Bendayan M. High-resolution ultrastructural study of the rat glomerular basement membrane in long-term experimental diabetes. *Ultrastruct Pathol* 1995;19(3):175-85.
98. Caramori ML, Kim Y, Huang C, *et al.* Cellular basis of diabetic nephropathy: 1. Study design and renal structural-functional relationships in patients with long-standing type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;51(2):506-13.
99. Adler S. Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1994;5(5):1165-72.
100. Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1999;56(2):393-405.
101. Wolf G, Schroeder R, Zahner G, *et al.* High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells requires p27(Kip1), an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Am J Pathol* 2001;158(3):1091-100.
102. Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, *et al.* High glucose stimulates expression of p27Kip1 in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy. *Am J Physiol* 1997;273(3 Pt 2):F348-56.
103. Wolf G. Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2000;77:S59-66.
104. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9(10):1149-63.
105. Wolf G, Reinking R, Zahner G, *et al.* Erk 1,2 phosphorylates p27(Kip1): Functional evidence for a role in high glucose-induced hypertrophy of mesangial cells. *Diabetologia* 2003;46(8):1090-9.
106. Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, *et al.* Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(4):556-63.
107. Hostetter TH. Hyperfiltration and glomerulosclerosis. *Semin Nephrol* 2003;23(2):194-9.
108. Hayashi K, Epstein M, Loutzenhiser R, *et al.* Impaired myogenic responsiveness of the afferent arteriole in streptozotocin-induced diabetic rats: role of eicosanoid derangements. *J Am Soc Nephrol* 1992;2(11):1578-86.
109. Chen S, Wolf G, Ziyadeh FN. The renin-angiotensin system in diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol* 2001(135):212-21.
110. van der Zee R, Murohara T, Luo Z, *et al.* Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 1997;95(4):1030-7.
111. Ziyadeh FN. Different roles for TGF-beta and VEGF in the pathogenesis of the cardinal features of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82 Suppl 1:S38-41.
112. Sharma K, Deelman L, Madesh M, *et al.* Involvement of transforming growth factor-beta in regulation of calcium transients in diabetic vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(6):F1258-70.



113. Thomson SC, Vallon V, Blantz RC. Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286(1):F8-15.
114. Vallon V, Blantz R, Thomson S. The salt paradox and its possible implications in managing hypertensive diabetic patients. *Curr Hypertens Rep* 2005;7(2):141-7.
115. Price DA, Porter LE, Gordon M, *et al.* The paradox of the low-renin state in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(11):2382-91.
116. Zhang SL, Filep JG, Hohman TC, *et al.* Molecular mechanisms of glucose action on angiotensinogen gene expression in rat proximal tubular cells. *Kidney Int* 1999;55(2):454-64.
117. Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG, *et al.* High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 2002;143(8):2975-85.
118. Ballermann BJ, Skorecki KL, Brenner BM. Reduced glomerular angiotensin II receptor density in early untreated diabetes mellitus in the rat. *Am J Physiol* 1984;247(1 Pt 2):F110-6.
119. Kalinyak JE, Sechi LA, Griffin CA, *et al.* The renin-angiotensin system in streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. *J Am Soc Nephrol* 1993;4(6):1337-45.
120. Mizuiri S, Yoshikawa H, Tanegashima M, *et al.* Renal ACE immunohistochemical localization in NIDDM patients with nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1998;31(2):301-7.
121. Singh R, Singh AK, Alavi N, *et al.* Mechanism of increased angiotensin II levels in glomerular mesangial cells cultured in high glucose. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(4):873-80.
122. Vidotti DB, Casarini DE, Cristovam PC, *et al.* High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286(6):F1039-45.
123. Miyata K, Ohashi N, Suzaki Y, *et al.* Sequential activation of the reactive oxygen species/angiotensinogen/renin-angiotensin system axis in renal injury of type 2 diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35(8):922-7.
124. Singh R, Singh AK, Leehey DJ. A novel mechanism for angiotensin II formation in streptozotocin-diabetic rat glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288(6):F1183-90.
125. Huang XR, Chen WY, Truong LD, *et al.* Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(7):1738-47.
126. Hoffmann S, Podlich D, Hähnel B, *et al.* Angiotensin II type 1 receptor overexpression in podocytes induces glomerulosclerosis in transgenic rats. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(6):1475-87.
127. Yoo TH, Li JJ, Kim JJ, *et al.* Activation of the renin-angiotensin system within podocytes in diabetes. *Kidney Int* 2007;71(10):1019-27.
128. Gross ML, El-Shakmak A, Szábo A, *et al.* ACE-inhibitors but not endothelin receptor blockers prevent podocyte loss in early diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2003;46(6):856-68.
129. Kelly DJ, Aaltonen P, Cox AJ, *et al.* Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(7):1327-32.
130. Navarro-González JF, Mora-Fernández C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(3):433-42.
131. Amann B, Tinzmann R, Angelkort B. ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1. *Diabetes Care* 2003;26(8):2421-5.
132. Kang YS, Park YG, Kim BK, *et al.* Angiotensin II stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor through the p38 mitogen activated protein kinase pathway in cultured mouse podocytes. *J Mol Endocrinol* 2006;36(2):377-88.
133. Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for tgf-Beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 2004;15 Suppl 1:S55-7.

134. Kagami S, Border WA, Miller DE, *et al.* Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994;93(6):2431-7.
135. Sharma K, Eltayeb BO, McGowan TA, *et al.* Captopril-induced reduction of serum levels of transforming growth factor-beta1 correlates with long-term renoprotection in insulin-dependent diabetic patients. *Am J Kidney Dis* 1999;34(5):818-23.
136. Hoffman BB, Sharma K, Zhu Y, *et al.* Transcriptional activation of transforming growth factor-beta1 in mesangial cell culture by high glucose concentration. *Kidney Int* 1998;54(4):1107-16.
137. Sharma K, Ziyadeh FN. Renal hypertrophy is associated with upregulation of TGF-beta 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. *Am J Physiol* 1994;267(6 Pt 2):F1094-01.
138. Cohen MP, Sharma K, Guo J, *et al.* The renal TGF-beta system in the db/db mouse model of diabetic nephropathy. *Exp Nephrol* 1998;6(3):226-33.
139. 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 antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(14):8015-20.
140. Remuzzi G, Ruggenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int* 1997;51(1):2-15.
141. Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev* 2008;4(1):39-45.
142. Wolf G, Ziyadeh FN. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 2007;106(2):p26-31.
143. Steffes MW, Schmidt D, McCrery R, *et al.* Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney Int* 2001;59(6):2104-13.
144. Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia* 1999;42(11):1341-4.
145. White KE, Bilous RW, Marshall SM, *et al.* Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes* 2002;51(10):3083-9.
146. Berg UB, Torbjörnsdotter TB, Jaremko G, *et al.* Kidney morphological changes in relation to long-term renal function and metabolic control in adolescents with IDDM. *Diabetologia* 1998;41(9):1047-56.
147. Tufro A, Veron D. VEGF and podocytes in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2012;32(4):385-93.
148. Chiarelli F, Spagnoli A, Basciani F, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) in children, adolescents and young adults with Type 1 diabetes mellitus: relation to glycaemic control and microvascular complications. *Diabet Med* 2000;17(9):650-6.
149. de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, *et al.* Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(5):993-1000.
150. Flyvbjerg A, Dagnaes-Hansen F, De Vriese AS, *et al.* Amelioration of long-term renal changes in obese type 2 diabetic mice by a neutralizing vascular endothelial growth factor antibody. *Diabetes* 2002;51(10):3090-4.
151. Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling. *Cell Res* 2007;17(8):666-81.
152. Lieberthal W, Levine JS. Mammalian target of rapamycin and the kidney. I. The signaling pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;303(1):F1-10.
153. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998;31(5):335-40.
154. Kunz J, Schneider U, Howald I, *et al.* HEAT repeats mediate plasma membrane localization of Tor2p in yeast. *J Biol Chem* 2000;275(47):37011-20.

155. Dames SA, Mulet JM, Rathgeb-Szabo K, *et al.* The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *J Biol Chem* 2005;280(21):20558-64.
156. Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, *et al.* Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* 2005;30(4):194-204.
157. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, *et al.* Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 1997;22(7):267-72.
158. Toker A, Newton AC. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 2000;103(2):185-8.
159. McManus EJ, Collins BJ, Ashby PR, *et al.* The in vivo role of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> binding to PDK1 PH domain defined by knockin mutation. *EMBO J* 2004;23(10):2071-82.
160. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, *et al.* Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005;307(5712):1098-101.
161. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 20):3589-94.
162. Zhou H, Huang S. The complexes of mammalian target of rapamycin. *Curr Protein Pept Sci* 2010;11(6):409-24.
163. Oshiro N, Yoshino K, Hidayat S, *et al.* Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells* 2004;9(4):359-66.
164. Wang L, Harris TE, Roth RA, *et al.* PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem* 2007;282(27):20036-44.
165. Schalm SS, Blenis J. Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr Biol* 2002;12(8):632-9.
166. Kaizuka T, Hara T, Oshiro N, *et al.* Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J Biol Chem* 2010;285(26):20109-16.
167. Lieberthal W, Levine JS. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(12):2493-502.
168. Huber TB, Walz G, Kuehn EW. mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression. *Kidney Int* 2011;79(5):502-11.
169. Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci* 2005;30(1):35-42.
170. Inoki K, Li Y, Zhu T, *et al.* TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002;4(9):648-57.
171. Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med* 2006;355(13):1345-56.
172. Cai SL, Tee AR, Short JD, *et al.* Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol* 2006;173(2):279-89.
173. Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* 2009;37(Pt 1):217-22.
174. Sekulić A, Hudson CC, Homme JL, *et al.* A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* 2000;60(13):3504-13.
175. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, *et al.* Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005;121(2):179-93.
176. Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, *et al.* Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 2001;294(5548):1942-5.
177. Foster DA. Regulation of mTOR by phosphatidic acid? *Cancer Res* 2007;67(1):1-4.
178. Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, *et al.* Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(40):14238-43.
179. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008;30(2):214-26.

180. Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;196(1):65-80.
181. Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, *et al.* Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* 2005;280(37):32081-9.
182. Schneider A, Younis RH, Gutkind JS. Hypoxia-induced energy stress inhibits the mTOR pathway by activating an AMPK/REDD1 signaling axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 2008;10(11):1295-302.
183. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, *et al.* Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 2004;18(23):2893-904.
184. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004;18(16):1926-45.
185. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 1999;68:913-63.
186. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12(1):21-35.
187. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, *et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004;14(14):1296-302.
188. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006;22(2):159-68.
189. Hughes KJ, Kennedy BK. Cell biology. Rapamycin paradox resolved. *Science* 2012;335(6076):1578-9.
190. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, *et al.* Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 2011;144(5):757-68.
191. Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, *et al.* The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol* 2008;28(12):4104-15.
192. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, *et al.* Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 2004;6(11):1122-8.
193. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, *et al.* SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 2006;127(1):125-37.
194. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, *et al.* Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 2006;11(6):859-71.
195. García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 2008;416(3):375-85.
196. Jones KT, Greer ER, Pearce D, *et al.* Rictor/TORC2 regulates *Caenorhabditis elegans* fat storage, body size, and development through *sgk-1*. *PLoS Biol* 2009;7(3):e60.
197. Astrinidis A, Henske EP. Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene* 2005;24(50):7475-81.
198. Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 2005;37(1):19-24.
199. Johannessen CM, Reczek EE, James MF, *et al.* The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(24):8573-8.
200. Bausch B, Borozdin W, Neumann HP, *et al.* Clinical and genetic characteristics of patients with neurofibromatosis type 1 and pheochromocytoma. *N Engl J Med* 2006;354(25):2729-31.
201. Opocher G, Conton P, Schiavi F, *et al.* Pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease and neurofibromatosis type 1. *Fam Cancer* 2005;4(1):13-6.
202. Favier J, Igaz P, Burnichon N, *et al.* Rationale for anti-angiogenic therapy in pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Pathol* 2012;23(1):34-42.

203. Pinato DJ, Ramachandran R, Toussi ST, *et al.* Immunohistochemical markers of the hypoxic response can identify malignancy in pheochromocytomas and paragangliomas and optimize the detection of tumours with VHL germline mutations. *Br J Cancer* 2013;108(2):429-37.
204. Druce MR, Kaltsas GA, Fraenkel M, *et al.* Novel and evolving therapies in the treatment of malignant pheochromocytoma: experience with the mTOR inhibitor everolimus (RAD001). *Horm Metab Res* 2009;41(9):697-702.
205. Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004;22(14):2954-63.
206. Inoki K. Role of TSC-mTOR pathway in diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82 Suppl 1:S59-62.
207. Lee MJ, Feliers D, Mariappan MM, *et al.* A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292(2):F617-27.
208. Yang Y, Wang J, Qin L, *et al.* Rapamycin prevents early steps of the development of diabetic nephropathy in rats. *Am J Nephrol* 2007;27(5):495-502.
209. Lloberas N, Cruzado JM, Franquesa M, *et al.* Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(5):1395-404.
210. Nagai K, Matsubara T, Mima A, *et al.* Gas6 induces Akt/mTOR-mediated mesangial hypertrophy in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005;68(2):552-61.
211. Sakaguchi M, Isono M, Isshiki K, *et al.* Inhibition of mTOR signaling with rapamycin attenuates renal hypertrophy in the early diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340(1):296-301.
212. Chen JK, Chen J, Thomas G, *et al.* S6 kinase 1 knockout inhibits uninephrectomy- or diabetes-induced renal hypertrophy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297(3):F585-93.
213. Mori H, Inoki K, Masutani K, *et al.* The mTOR pathway is highly activated in diabetic nephropathy and rapamycin has a strong therapeutic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;384(4):471-5.
214. Feliers D, Duraisamy S, Faulkner JL, *et al.* Activation of renal signaling pathways in db/db mice with type 2 diabetes. *Kidney Int* 2001;60(2):495-504.
215. Fraenkel M, Ketzinel-Gilad M, Ariav Y, *et al.* mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes* 2008;57(4):945-57.
216. Letavernier E, Pe'raldi MN, Pariente A, *et al.* Proteinuria following a switch from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Transplantation* 2005;80(9):1198-203.
217. Letavernier E, Legendre C. mTOR inhibitors-induced proteinuria: mechanisms, significance, and management. *Transplant Rev (Orlando)* 2008;22(2):125-30.
218. Letavernier E, Bruneval P, Mandet C, *et al.* High sirolimus levels may induce focal segmental glomerulosclerosis de novo. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2(2):326-33.
219. Forlenza GP, Rewers M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011;18(4):248-51.
220. Gassler N, Elger M, Kränzlin B, *et al.* Podocyte injury underlies the progression of focal segmental glomerulosclerosis in the fa/fa Zucker rat. *Kidney Int* 2001;60(1):106-16.
221. Coimbra TM, Janssen U, Gröne HJ, *et al.* Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney Int* 2000;57(1):167-82.
222. Captopril reduces the risk of nephropathy in IDDM patients with microalbuminuria. The Microalbuminuria Captopril Study Group. *Diabetologia* 1996;39(5):587-93.
223. Hafizi S, Wang X, Chester AH, *et al.* ANG II activates effectors of mTOR via PI3-K signaling in human coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(3):H1232-8.
224. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 2011;23(10):1515-27.

225. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115(5):577-90.
226. Troyer DA, Kreisberg JJ. Isolation and study of glomerular cells. *Methods Enzymol* 1990;191:141-52.
227. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques* 2007;42(1):71-5.
228. Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, *et al.* Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(11):2893-902.
229. Nemoto S, Kobayashi T, Taguchi K, *et al.* Losartan improves aortic endothelium-dependent relaxation via proline-rich tyrosine kinase 2/Src/Akt pathway in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301(6):H2383-94.
230. Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML. Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3 $\beta$ /mTOR signaling pathway. *Basic Res Cardiol* 2009;104(6):653-67.
231. Zhu J, Sun N, Aoudjit L, *et al.* Nephrin mediates actin reorganization via phosphoinositide 3-kinase in podocytes. *Kidney Int* 2008;73(5):556-66.
232. Inoki K, Mori H, Wang J, *et al.* mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J Clin Invest* 2011;121(6):2181-96.
233. Menne J, Meier M, Park JK, *et al.* Nephrin loss in experimental diabetic nephropathy is prevented by deletion of protein kinase C  $\alpha$  signaling in-vivo. *Kidney Int* 2006;70(8):1456-62.
234. Cohen MP, Chen S, Ziyadeh FN, *et al.* Evidence linking glycated albumin to altered glomerular nephrin and VEGF expression, proteinuria, and diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005;68(4):1554-61.
235. Davis BJ, Forbes JM, Thomas MC, *et al.* Superior renoprotective effects of combination therapy with ACE and AGE inhibition in the diabetic spontaneously hypertensive rat. *Diabetologia* 2004;47(1):89-97.
236. Doublier S, Salvidio G, Lupia E, *et al.* Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes* 2003;52(4):1023-30.
237. Toyoda M, Suzuki D, Umezono T, *et al.* Expression of human nephrin mRNA in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(2):380-5.
238. Aaltonen P, Luimula P, Aström E, *et al.* Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Lab Invest* 2001;81(9):1185-90.
239. Sung SH, Ziyadeh FN, Wang A, *et al.* Blockade of vascular endothelial growth factor signaling ameliorates diabetic albuminuria in mice. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(11):3093-104.
240. Cooper ME, Mundel P, Boner G. Role of nephrin in renal disease including diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2002;22(5):393-8.
241. Kim JJ, Li JJ, Jung DS, *et al.* Differential expression of nephrin according to glomerular size in early diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(8):2303-10.
242. Gödel M, Hartleben B, Herbach N, *et al.* Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *J Clin Invest* 2011;121(6):2197-209.
243. Ding HL, Xu MT, Guo Y, *et al.* Effect of losartan on the mRNA expressions of MT3-MMP and TIMP-2 in diabetic kidneys. *Rev Diabet Stud* 2005;2(4):216-20.
244. Zhang Y, Deb DK, Kong J, *et al.* Long-term therapeutic effect of vitamin D analog doxercalciferol on diabetic nephropathy: strong synergism with AT1 receptor antagonist. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297(3):F791-801.

