

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Η Ραπαμυκίνη περιορίζει την πρωτεϊνουρία και επαναφέρει την έκφραση των ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών των σχισμών διήθησης της βασικής μεμβράνης σε πειραματικό μοντέλο μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας.**

**Στρατάκης Σταύρος**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ**

**&**

**ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΓΝΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ**

**Ε. Δαφνής** Αναπλ. Καθηγητής Νεφρολογίας

**Δ. Μπούμπας** Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας

**Γ. Τζανακάκης** Καθηγητής Ανατομίας-Ιστολογίας

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν καθιονδήποτε τρόπο.

Καταρχάς τον διευθυντή μου και αναπληρωτή καθηγητή νεφρολογίας κ. Ευγένιο Δαφνή, ο οποίος είναι ο επιστημονικός πατέρας της παρούσας εργασίας.

Τον καθηγητή κ. Βλαχάκο Δημήτρη, ο οποίος άναψε τη σπίθα ενασχόλησής μου με την Νεφρολογία.

Τον επιμ. Α Στυλιανού Κωνσταντίνο για την ηθική και πνευματική υποστήριξη που μου παρείχε τόσο κατά το διάστημα παρουσίας μου στο εργαστήριο Νεφρολογίας, όσο και μετέπειτα στη διαδρομή μου ως ειδικευόμενος Νεφρολογίας. Αποτελεί πάντα την καρδιά και το μυαλό σε οτιδήποτε καινοτόμο συμβαίνει στο χώρο εργασίας του.

Στους αγαπητούς συνεργάτες στη Νεφρολογική κλινική Διευθυντές κο Περάκη Κωνσταντίνο, κα Βαρδάκη Ελευθερία και κο Στρατήγη Σπυρίδων για την σταθερή παρουσία τους όλα αυτά τα χρόνια στην Νεφρολογική κλινική, η οποία και υποστήριξε έμπρακτα όλη αυτή την προσπάθεια.

Τους φίλους και συνεργάτες στο εργαστήριο νεφρολογίας, Πετράκη Ιωάννη, Μωϋσιάδη Δημήτρη, Μαυροειδή Βασιλική και Καστρινάκη Χριστίνα χωρίς την φιλότιμη υποστήριξη και τις εξαιρετικές ικανότητες των οποίων, θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Τέλος ευχαριστώ τη σύζυγό μου Κελαϊδώνη Θεοδώρα και τα παιδιά μας Γιάννη και Ηλία για την υποστήριξη και την υπομονή τους, τους γονείς μου διότι σε όλη μου τη διαδρομή ήταν πάντα στυλοβάτες και φυσικά την αγαπημένη μου θεία Αλεξίου Στυλιανή η οποία παραμένει πρότυπο οξυδέρκειας και ανήσυχου πνεύματος.

Ηράκλειο 4-08-2015

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ιστολογία του νεφρικού σπειράματος.....	6
1.1 Αδρή ιστολογική υφή του σπειράματος.....	6
1.2 Σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα ή ποδοκύτταρα.....	7
1.2.1 Ανάπτυξη των ποδοκυττάρων.....	7
1.2.2 Δομή των ποδοκυττάρων.....	9
1.3 Βασική μεμβράνη του σπειράματος.....	10
1.4 Ενδοθηλιακά κύτταρα.....	10
1.5 Μεσάγγειο.....	11
2. Σπειραματικός ηθμός.....	12
2.1 Μοριακή δομή και βιολογία του σπειραματικού ηθμού.....	12
2.2 Οι πρωτεΐνες του διαφράγματος της σχισμής διήθησης .....	13
2.2.1 Νεφρίνη, ποδοσίνη και CD2AP (CD2 associated protein).....	13
2.2.2 ZO-1, FAT1 και P-καντχερίνη (P-cadherin).....	15
2.2.3 NEPH και Ντεσίνη.....	15
2.3 Οι πρωτεΐνες της κορυφαίας (αυλικής) επιφάνειας.....	16
2.3.1 Ποδοκαλυξίνη και εζρίνη.....	16
2.3.2 NHERF2 και μεγκαλίνη.....	16
2.4 Πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης και ο ρόλος τους.....	17
2.4.1 Κινάση συνδεόμενη με ιντεγκρίνη (Integrin Linked Kinase-ILK).....	18
2.5 Κυτταροσκελετός ποδοκυττάρων.....	18
2.5.1 Λειτουργίες κυτταροσκελετού.....	18
2.5.2 Δομικές μονάδες του κυτταροσκελετού.....	19
3. Ιδιοπαθής Μεμβρανώδη Σπειραματοπάθεια.....	21
3.1 Παθοφυσιολογία.....	21
3.1.2 Μελέτες σε ζώα .....	23
3.1.1 Μελέτες σε άνθρωπο .....	26
3.2 Θεραπεία Μεμβρανώδους σπειραματοπάθεια.....	31
3.2.1 Θεραπείες σε ζωϊκά μοντέλα.....	31

3.2.2 Θεραπείες στον άνθρωπο.....	34
4. mTOR, RAPTOR και ο διάλογος akt.....	40
4.1 Η mTOR κινάση.....	40
4.2 Τα συμπλέγματα TORC1 και TORC2.....	41
4.3 Οι ρυθμιστές της mTOR.....	43
4.3.1 Η ρύθμιση της mTOR από τα θρεπτικά συστατικά.....	43
4.3.2 Η ρύθμιση της mTOR από αυξητικούς παράγοντες.....	44
4.3.3 Η ρύθμιση της mTOR από την ενέργεια.....	49
4.3.4 Η ρύθμιση της mTOR από τις MAP κινάσες και τον TNFα.....	50
5. Φαρμακολογία της ραπαμυκίνης (rapamycin ή sirolimus) και καθιερωμένες κλινικές εφαρμογές.....	51
5.1 Μηχανισμός δράσης.....	51
5.2 Φαρμακοκινητική.....	51
5.3 Μεταβολισμός.....	52
5.4 Ανεπιθύμητες ενέργειες.....	53
5.5 Φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις.....	55
6. Θεραπευτικές εφαρμογές της ραπαμυκίνης σε νεφρικές παθήσεις πέραν της μεταμόσχευσης νεφρού.....	56
6.1 Η επίδραση της ραπαμυκίνης στο φυσιολογικό νεφρό.....	58
6.2 Η επίδραση της ραπαμυκίνης στους πολυκυστικούς νεφρούς.....	60
6.3 Επίδραση της ραπαμυκίνης στον καρκίνο του νεφρού.....	61
6.3.1 Διαυγοκυτταρικός νεφρικός καρκίνος.....	61
6.3.2 Νεφρικοί όγκοι σχετιζόμενοι με οξώδη σκλήρυνση.....	62
6.4 Επίδραση της ραπαμυκίνης στην οξεία νεφρική βλάβη (ONB).....	63
6.4.1 Ζωικά πρότυπα.....	63
6.4.2 Μελέτες σε ανθρώπους.....	64
7. Η επίδραση της ραπαμυκίνης σε σπειραματοπάθειες.....	66
7.1 Ζωικά πρότυπα.....	66
7.1.1 Σπειραματοπάθειες που συνοδεύονται από νεφρωσικού επιπέδου πρωτεϊνουρία χωρίς υπερπλασία σπειραματικών κυττάρων.....	66

7.1.2 Μεσαγγειοϋπερπλαστική ΣΝΦ (μοντέλο Anti-thy1).....	67
7.1.3 Πειραματική θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια.....	68
7.1.4. Πειραματικά πρότυπα νεφρίτιδας του λύκου σε επίμυες.....	68
7.1.5 Μηνοειδής σπειραματοπάθεια.....	68
7.1.6 Διαβητική νεφροπάθεια.....	69
7.1.7. Μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια.....	70
7.2 Μελέτες σε ανθρώπους.....	71
7.3 Συστηματικές επιδράσεις της ραπαμυκίνης με πιθανή επίδραση στη νεφρική λειτουργία.....	73

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της μελέτης.....	75
2. Υλικά και μέθοδοι.....	77
3. Αποτελέσματα.....	83
3.1 Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά.....	83
3.2 Φωτονικό μικροσκόπιο, ανοσοφθορισμός και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	85
3.3 Έκφραση νεφρίνης και ποδοσίνης.....	87
4. Συζήτηση.....	91
5. Ελληνική Περίληψη.....	95
6. Αγγλική Περίληψη.....	100
Βιβλιογραφία.....	104

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

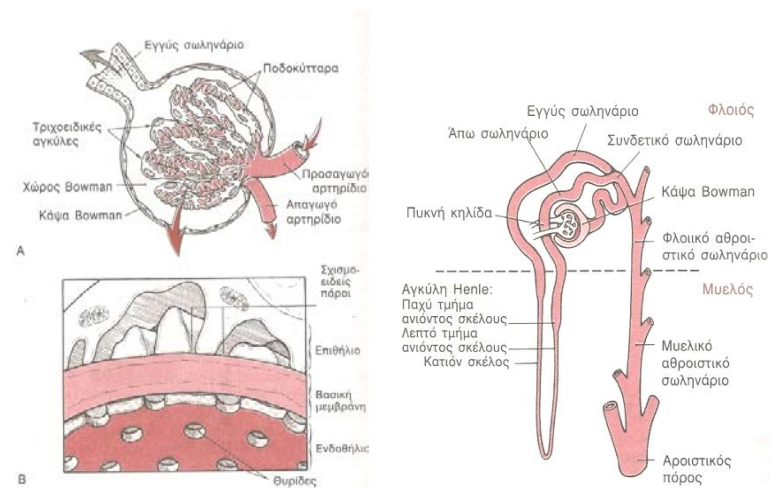
### 1. Ιστολογία του νεφρικού σπειράματος

#### **1.1 Αδρή ιστολογική δομή του σπειράματος**

Ο κάθε νεφρός έχει 1.000.000 νεφρώνες και καθένας από αυτούς αποτελείται από δυο τμήματα: το μαλπιγγειανό σωμάτιο και το σωληνάριο, διαμέσου του οποίου το παραγόμενο πύουρο μεταφέρεται στη νεφρική πύελο. Το μαλπιγγειανό σωμάτιο αποτελείται από το σπείραμα το οποίο συνίσταται από ένα δίκτυο διακλαδιζόμενων και αναστομούμενων μεταξύ τους τριχοειδών που καλύπτονται από επιθηλιακά κύτταρα και το οποίο περιβάλλεται από την κάψα του Bowman. Το διήθημα που παράγεται στο χώρο του Bowman προωθείται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, το οποίο βρίσκεται στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού και ακολούθως στην αγκύλη του Henle, η οποία εισέρχεται στη μυελώδη μοίρα του νεφρού. Κάθε αγκύλη αποτελείται από ένα κατιόν λεπτό σκέλος και ένα ανιόν σκέλος. Το ανιόν όσο ανέρχεται προς το φλοιό μεταπίπτει στο παχύ σκέλος της αγκύλης <sup>1</sup> (Εικόνα 1). Στη συνέχεια, το διήθημα διοχετεύεται στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο, που βρίσκεται στη φλοιώδη μοίρα. Αυτό ακολουθείται από το συνδετικό σωληνάριο και το αθροιστικό σωληνάριο το οποίο φέρεται στον αθροιστικό πόρο του φλοιού. Τα αρχικά τμήματα 8-10 αθροιστικών πόρων του φλοιού συγκλίνουν για να σχηματίσουν το μεγαλύτερο αθροιστικό πόρο, που φέρεται προς τη μυελώδη μοίρα και αποτελεί τον αθροιστικό πόρο του μυελού. Οι αθροιστικοί πόροι συνενώνονται για να σχηματίσουν μεγαλύτερους πόρους, οι οποίοι διοχετεύουν το περιεχόμενό τους στους νεφρικούς κάλυκες, διαμέσου σχισμοειδών στομιών που βρίσκονται στις κορυφές των θηλών του νεφρού. Σε κάθε νεφρό υπάρχουν περίπου 250 πολύ μεγάλοι αθροιστικοί πόροι και σε καθένα από αυτούς φέρονται τα ούρα από περίπου 4000 νεφρώνες<sup>1</sup> (Εικόνα 1).

Το αίμα φτάνει στα τριχοειδή του σπειράματος διαμέσου των προσαγωγών αρτηριδίων. Κάθε προσαγωγό αρτηρίδιο διακλαδίζεται σε 6-8 τριχοειδείς αγκύλες, όπου λαμβάνει χώρα η διήθηση του ορού του αίματος. Οι τριχοειδείς αγκύλες συγκλίνουν στο απαγωγό αρτηρίδιο, το οποίο ακολουθείται από το σχηματισμό ενός δευτέρου τριχοειδικού δικτύου, το οποίο περιβάλλει τα νεφρικά σωληνάρια. Τα

τριχοειδή κάθε αγκύλης περιελίσσονται γύρω από μια κεντρική περιοχή, το μεσάγγειο, το οποίο αποτελείται από τα μεσαγγειακά κύτταρα και την μεσάγγειο ουσία. Στο τοίχωμα των τριχοειδών εκ των έξω προς τα έσω διακρίνουμε τρεις στιβάδες: τη στοιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων ή ποδοκυττάρων, τη βασική μεμβράνη του σπειράματος (ΣΒΜ) και τη στοιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων οι οποίες σχηματίζουν το φραγμό διήθησης. Στην μεσαγγειακή πλευρά των τριχοειδών, το ενδοθήλιο βρίσκεται σε άμεση επαφή με το μεσάγγειο<sup>1</sup> (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** Αριστερή εικόνα. Α. Τρισδιάστατη δομή των τριχοειδών του σπειράματος. Β. Διατομή της τριχοειδικής μεμβράνης τριχοειδούς του σπειράματος και οι κυριότερες συνιστώσες. Δεξιά εικόνα. Τα βασικά σωληναριακά τμήματα του νεφρώνα. Από: Guyton & Hall, 2000

## 1.2 Σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα ή ποδοκύτταρα

Τα ποδοκύτταρα είναι κύτταρα με πολύπλοκη κυτταρική οργάνωση. Ονομάστηκαν έτσι γιατί διαθέτουν μεγάλο αριθμό πρωτογενών κυτταροπλασματικών προσεκβολών (ποδικές εκβλαστήσεις), οι οποίες περιβάλλουν τη βασική μεμβράνη του τοιχώματος, δίνοντας στα κύτταρα την εικόνα του χταποδιού. Σύμφωνα με την αρχιτεκτονική τους, τα ποδοκύτταρα διαιρούνται δομικά και λειτουργικά σε τρία διαφορετικά τμήματα: το σώμα του κυττάρου, την κύρια προσεκβολή και τη δευτερογενή προσεκβολή. Το σώμα του κυττάρου και η κύρια προσεκβολή δεν είναι προσκολλημένα στη βασική μεμβράνη του σπειράματος, αλλά επιπλέουν ελεύθερα στο χώρο του Bowman, αφήνοντας ελεύθερο χώρο μεταξύ του σώματος και των δευτερογενών προσεκβολών. Οι δευτερογενείς προσεκβολές γειτονικών κυττάρων

δημιουργούν τη σχισμή διήθησης (ΣΔ). Οι σχισμές διήθησης αποφράσσονται από ένα διάφραγμα (Διάφραγμα σχισμής διηθήσεως ή Λεπτό Διάφραγμα, (ΛΔ)) <sup>2</sup>.

Το ΛΔ σε εγκάρσια τομή στο ηλεκτρονικού μικροσκοπίου φαίνεται σαν μια λεπτή κλωστή, που συγκρατεί δυο γειτονικές ποδικές εκβλαστήσεις, ενώ όταν παρατηρείται από τη πλευρά του ουρικού πόλου παρουσιάζεται σαν «φερμουάρ» το οποίο ενώνει τις ποδικές εκβλαστήσεις (εικόνα 2). Η δομή αυτή αποτελεί το φραγμό μεγέθους στη διήθηση μορίων και συμβάλλει στην αύξηση της αντίστασης των σπειραματικών τριχοειδών στις δυνάμεις διατάσεως, που οφείλονται στην υδροστατική πίεση του αυλού τους. Ο μηχανισμός αυτός ασκεί συνέχεια πίεση στη ΣΒΜ, η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας της. Η επιφάνεια των ποδοκυττάρων και οι προσεκβολές τους καλύπτονται από ένα στρώμα γλυκοπρωτεϊνών με ισχυρό αρνητικό φορτίο, που συνιστούν ένα άλλο φραγμό στη διήθηση μακρομορίων, το φραγμό φορτίου. Στο φραγμό φορτίου εκτός από τα ποδοκύτταρα συμμετέχουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και η ΣΒΜ <sup>2</sup>.

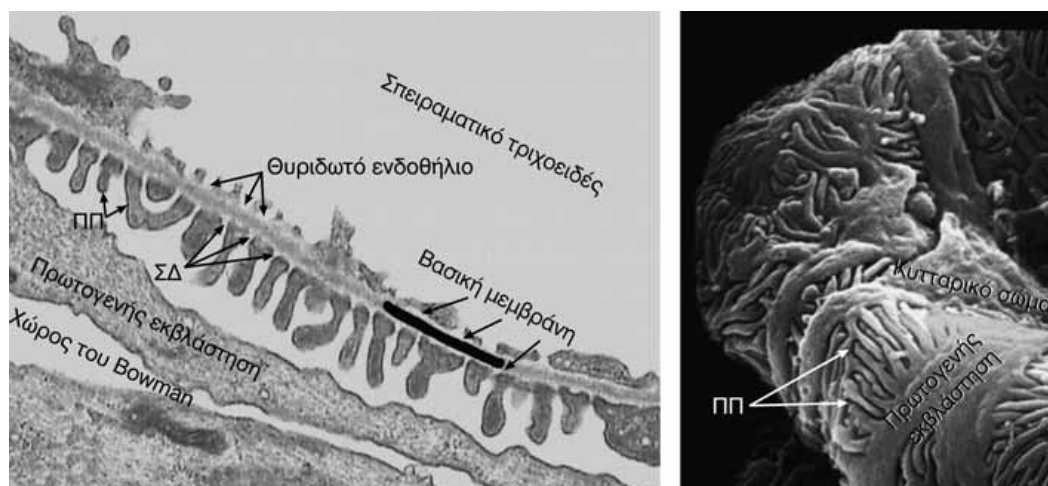
### 1.2.1 Ανάπτυξη των ποδοκυττάρων

Τα ποδοκύτταρα προκύπτουν κατά την οργανογένεση από μετανεφρικά μεσεγχυματικά κύτταρα <sup>3</sup>. Τα μεσεγχυματικά αυτά κύτταρα σταδιακά μεταμορφώνονται σε επιθηλιακά, αποτελώντας τις πρόδρομες μορφές, των ποδοκυττάρων. Ο κυτταρικός κύκλος των τελικά διαφοροποιημένων ποδοκυττάρων βρίσκεται σε παύση. Αυτό οφείλεται στην ισορροπημένη έκφραση των μορίων που προάγουν τον κυτταρικό κύκλο, όπως είναι οι κυκλίνες και οι εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες με τους ανταγωνιστές τους, αναστολείς της κινάσης των κυκλινών. Τα ώριμα ποδοκύτταρα εκφράζουν πρωτεΐνες που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο, όπως είναι οι p27, p21 και p57, ενώ παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση πρωτεϊνών που τον προάγουν, όπως οι κυκλίνες A, D, B1 και Ki-67. Μολονότι είναι τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα αυτά μπορούν να αναγεννηθούν από τα κύτταρα της κάψας του Bowman <sup>4</sup>.



### 1.2.2 Δομή των ποδοκυττάρων

Τα ποδοκύτταρα χαρακτηρίζονται από μια εξαιρετικά εξειδικευμένη δομή και μοριακή αρχιτεκτονική (Εικόνα 2). Ο κυτταροσκελετός των ποδοκυττάρων αποτελείται από τρία συστατικά: τα μικροϊνίδια (διαμέτρου 7-9 nm), τα ενδιάμεσα ινίδια (διαμέτρου 10 nm) και τους μικροσωληνίσκους (διαμέτρου 24 nm). Οι μικροσωληνίσκοι και τα ενδιάμεσα ινίδια αποτελούν τον κύριο στηρικτικό μηχανισμό των πρωτογενών εκβλαστήσεων και του κυτταρικού σώματος. Οι ποδικές προσεκβολές περιέχουν ένα πυκνό δίκτυο μικροϊνιδίων ακτίνης, που συνδέονται λειτουργικά μέσω των μορίων του σχισμοειδούς διαφράγματος, και με τη ΣΒΜ. Μια άλλη πρωτεΐνη η οποία αποτελεί συστατικό των ποδοκυττάρων είναι η συναπτοποδίνη. Η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει τη σύνδεση της F-ακτίνης και συνδέει λειτουργικά τις πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης με εκείνες του σχισμοειδούς διαφράγματος μέσω του κυτταροσκελετού. Τα μόρια αυτά συνδέονται με τη ΣΒΜ κυρίως μέσω των συμπλεγμάτων των  $\alpha\beta 1$ -ιντεγκρινών<sup>5</sup> (εικόνα 3).



**Εικόνα 2.** Η πολύπλοκη μορφολογία του ποδοκυττάρου, όπως απεικονίζεται με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διερχόμενης δέσμης (αριστερά) και σάρωσης (δεξιά). ΠΠ: ποδικές προσεκβολές. ΣΔ: διάφραγμα σχισμής διήθησης. Από: Κουτρούτσος & Νακοπούλου, 2009

Στη διαδικασία της υπερδιήθησης μεγάλη σημασία παρουσιάζει και ο υποποδοκυτταρικός χώρος. Ο χώρος αυτός βρίσκεται μεταξύ του σώματος των ποδοκυττάρων και των δευτερογενών ποδικών εκβλαστήσεων και οριοθετείται από τις πρωτογενείς εκβλαστήσεις (εικόνα 2). Καλύπτει το 60% της επιφάνειας διήθησης και αυξάνει την αντίσταση στη ροή του διηθήματος σε καταστάσεις αυξημένης

ενδοτριχοειδικής πίεσης. Θεωρείται ότι είναι σε θέση να δημιουργήσει συνθήκες αναστροφής της φυσιολογικής ροής διηθήματος και λειτουργεί ως μηχανισμός «καθαρισμού» του σπειραματικού διηθήματος <sup>6</sup>.

### **1.3 Βασική μεμβράνη του σπειράματος**

Η βασική μεμβράνη του σπειράματος διαχωρίζει το επιθήλιο από το ενδοθήλιο του σπειράματος και αποτελεί σημαντικό φραγμό στη διήθηση των πρωτεϊνών του πλάσματος. Η βασική μεμβράνη αποτελείται από τρεις στοιβάδες: μια παχιά κεντρική (το πυκνό πέταλο), το έσω πέταλο που έρχεται σε επαφή με το ενδοθήλιο και το έξω πέταλο που έρχεται σε επαφή με τα επιθηλιακά κύτταρα. Συντίθεται από ποδοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα και αποτελείται από κολλαγόνο IV, λαμινίνη, εντακτίνη και πρωτεογλυκάνες <sup>7</sup>.

Το σπειραματικό επιθήλιο, η κάψα του Bowman και τα σωληνάρια προέρχονται από το συμπύκνωμα των μεσεγγυματικών κυττάρων που αναγκάζονται να υποστούν επιθηλιακή διαφοροποίηση από το βλαστό του ουρητήρα. Σε μικρό χρονικό διάστημα ο αρχικός νεφρώνας εγκλωβίζεται από τα μεσεγγυματικά κύτταρα, τα οποία δημιουργούν το σπειραματικό ενδοθήλιο. Στα πρώιμα στάδια φαίνεται ότι το ενδοθήλιο και το επιθήλιο του σπειράματος συνθέτουν τη ΣΒΜ, σε ίση αναλογία. Καθώς, η ανάπτυξη συνεχίζεται, η σύνθεση της ΣΒΜ από το ενδοθήλιο αρχίζει να μειώνεται ή ακόμα και να σταματά. Αντίθετα, η σύνθεση των πρωτεϊνών της ΣΒΜ από τα ποδοκύτταρα συνεχίζεται και νέα ΣΒΜ παράγεται κατά τη διαδικασία κατασκευής των ποδικών προεκβολών <sup>8</sup>.

### **1.4 Ενδοθηλιακά κύτταρα**

Η αυλική επιφάνεια των τριχοειδών καλύπτεται από μια στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία προσκολλώνται στη ΣΒΜ μέσω λεπτών ινιδίων. Το τριχοειδικό ενδοθήλιο είναι διάτρητο από χιλιάδες μικρές τρύπες που ονομάζονται θυρίδες, γι αυτό το κύτταρό του ονομάζεται θυριδωτό. Επιπρόσθετα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτονται από ένα λεπτό στρώμα γλυκοπρωτεΐνης πλούσιας σε σιαλικό οξύ, η οποία φορτίζει αρνητικά την επιφάνεια τους <sup>9</sup>.

### 1.5 Μεσάγγειο

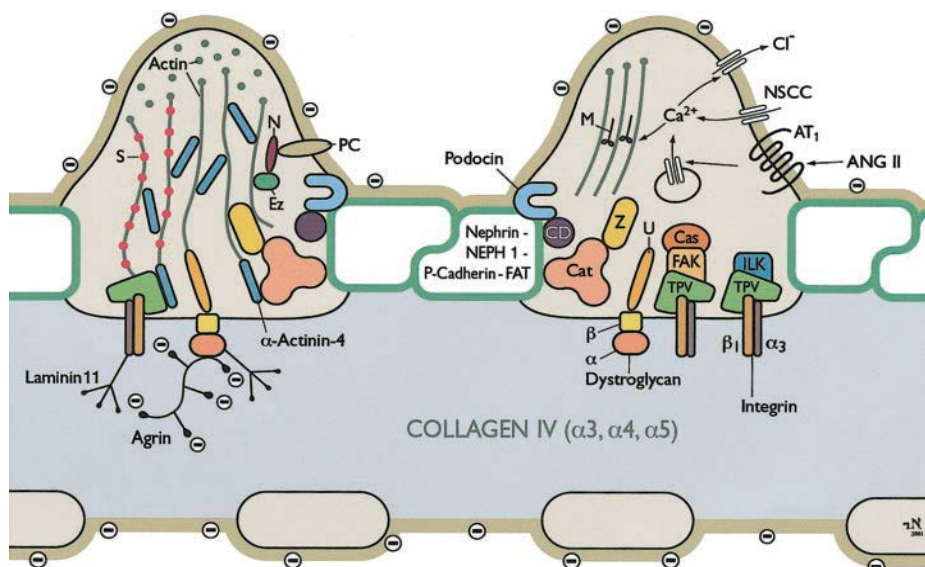
Το μεσάγγειο αποτελείται από τα μεσαγγειακά κύτταρα και τη μεταξύ αυτών άμορφη ουσία, η οποία καλείται μεσαγγειακή θεμέλιος ουσία. Τα κύτταρα του μεσαγγείου διακρίνονται σε αυτόχθονα ή τύπου I, σε κύτταρα τύπου II και σε κύτταρα τύπου III. Τα τύπου I προέρχονται πιθανότατα από τη διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων του προσαγωγού αρτηριδίου και έχουν την ικανότητα να ενδοκυτταρώνουν και να φαγοκυτταρώνουν. Εκκρίνουν κολλαγόνο IV και V, ινωδονεκτίνη και προσταγλανδίνες. Τα κύτταρα τύπου II εμφανίζουν χαρακτήρες μονοκυττάρων και μακροφάγων, ενώ τα τύπου III προέρχονται από κυκλοφορούντα μονοκύτταρα τα οποία παγιδεύονται στο μεσάγγειο του σπειράματος <sup>10</sup>.

Η μεσαγγειακή ουσία αποτελείται από πλήθος μορίων που συντίθενται και εκκρίνονται από τα μεσαγγειακά κύτταρα, όπως κολλαγόνο τύπου IV, ινωδονεκτίνη, ακτινομυοσίνη και χονδροϊτίνη. Ένα τμήμα των τριχοειδών του σπειράματος βρίσκεται σε επαφή με το μεσάγγειο με συνέπεια η διάμετρός τους να μεταβάλλεται ανάλογα με τη συσπαστική ή διασταλτική δράση του μεσαγγείου. Οι κυριότερες λειτουργίες του μεσαγγείου είναι: η πρόσληψη και απομάκρυνση μεγαλομοριακών ουσιών, όπως ανόργανα σωματίδια, πολυσακχαρίτες και ανοσοσυμπλέγματα, η ρύθμιση της σπειραματικής κυκλοφορίας, η παραγωγή ορμονών και δομικών πρωτεογλυκανών και η τοπική ανοσορρύθμιση-παραγωγή ελευθέρων ριζών <sup>10</sup>.

## 2. Σπειραματικός ηθμός

### 2.1 Μοριακή δομή και βιολογία του σπειραματικού ηθμού

Ο σπειραματικός ηθμός αποτελείται από το θυριδωτό ενδοθήλιο, τη ΣΒΜ και τις ποδοκυτταρικές προσεκβολές που ενώνονται μεταξύ τους με τα ΛΔ. Είναι διαπερατός από το νερό και τους ηλεκτρολύτες και άλλα μόρια μικρού μοριακού βάρους, αλλά αδιαπέραστος σε πρωτεΐνες με μέγεθος μεγαλύτερο των 70 kD. Το ΛΔ παρουσιάζει ομοιότητες με τις προσφύσεις των μεσοκυττάρων συνδέσμων και αποτελείται από ένα ευρύ μεσοκυττάριο διάκενο και μια κεντρική πυκνή γραμμή. Το ΛΔ αποτελεί τον φραγμό μεγέθους, ενώ το αρνητικό φορτίο της επιφάνειας των ποδοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και της ΣΒΜ αποτελεί το φραγμό φορτίου. Οι πρωτεΐνες που το αποτελούν είναι η νεφρίνη, η πρωτεΐνη των στενών συνδέσμων, η ZO-1 (zonula occludens), η ποδοσίνη, η CD2AP, η FAT, η P-καντχερίνη, η NEPH1 και η ντενσίνη. Όλα αυτά τα μόρια φαίνεται να είναι απαραίτητα για την ακεραιότητα του ΛΔ <sup>10</sup> (Εικόνα 3).

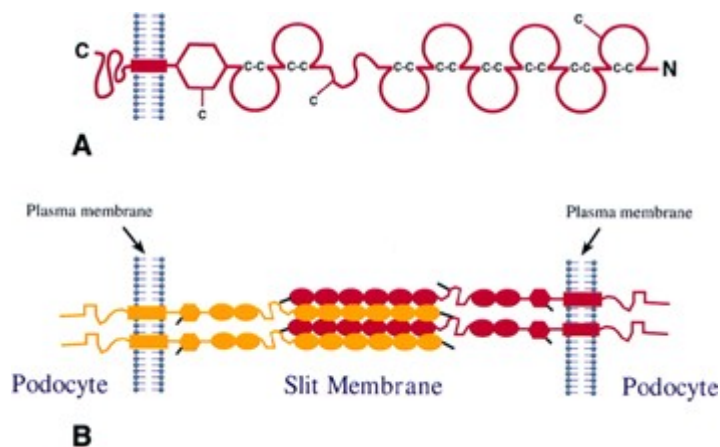


**Εικόνα 3.** Εγκάρσια διατομή δυο ποδοκυττάρων. Το ΛΔ είναι ορατό με τα μόριά του. Διακρίνεται η πλάγια, η βασική και η αυλική επιφάνεια, που συνδέεται με το κυτταροσκελετό. Από: Pavenstädt. Kriz. Kretzler 1988

## 2.2 Οι πρωτεΐνες του διαφράγματος της σχισμής διήθησης

### 2.2.1 Νεφρίνη, ποδοσίνη και CD2AP (CD2 associated protein)

Η νεφρίνη αποτελεί το πιο σημαντικό συστατικό του ΛΔ. Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών, με Μοριακό Βάρος (MB) 180 kDa και παράγεται αποκλειστικά από τα ποδοκύτταρα. Αποτελείται από ένα ενδοκυττάριο και ένα εξωκυττάριο τμήμα, το οποίο περιέχει ένα εγγύς τμήμα φιμπρονεκτίνης τύπου III<sup>10</sup>. Τα εξωκυττάρια αμινοτελικά άκρα των μορίων νεφρίνης δυο γειτονικών ποδικών προεκβολών, οι οποίες προέρχονται από δύο διαφορετικά ποδοκύτταρα συμπλέκονται συμβάλλοντας στη δομική και λειτουργική σύνδεση των ποδικών προεκβολών, ενώ το ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο συμμετέχει στη διαβίβαση μηνυμάτων προς το κυτταροσκελετό (Εικόνα 4). Η νεφρίνη επιδρά έμμεσα και στη σύσπαση του κυτταροπλάσματος, καθώς αλληλεπιδρά με το διαμεμβρανικό υποδοχέα TRPC6 (transient receptor potential ion channel 6), ο οποίος λειτουργεί ως αντλία ιόντων ασβεστίου και ρυθμίζει τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρίου ασβεστίου<sup>5</sup>. Η τριτοταγής δομή και η διαμεμβρανική της εντόπιση καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από τη γλυκοζυλίωση της στις θέσεις αζώτου<sup>11</sup>.



Εικόνα 4.Υποθετικό μοντέλο του λεπτού διαφράγματος της σχισμής διήθησης το οποίο σχηματίζεται από τη νεφρίνη. (A) Σχηματική απεικόνιση της Νεφρίνης. Τα ημικύκλια ολοκληρώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (C-C). Οι θέσεις της ελεύθερης κυστεΐνης συμβολίζονται με -C. (B) Αναδεικνύεται η πιθανή σύνδεση 4 μορίων νεφρίνης γειτονικών ποδοκυττάρων. Τα μόρια νεφρίνης του κάθε ποδοκυττάρου παρουσιάζονται με διαφορετικό χρώμα. Οι ελεύθερες μαύρες γέφυρες κυστεΐνης αποτελούν τις πιθανές θέσεις σύνδεσης με άλλα μόρια νεφρίνης.

Η νεφρίνη επιπρόσθετα επιδρά στον κυτταροσκελετό ακτίνης, μέσω ενός μηχανισμού αγωγής ερεθισμάτων των ποδικών προεκβολών προς αυτό. Η αγωγή των ερεθισμάτων επιτυγχάνεται με τη φωσφορυλίωση του ενδοκυττάριου καρβοξυτελικού άκρου της νεφρίνης και τη σύνδεσή του με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη Nck (non-catalytic tyrosine kinase adaptor protein). Το σύμπλοκο που προκύπτει συνδέεται με τη σειρά του με την N-WASP, (neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein), μέσω της οποίας επάγεται η δυναμική ρύθμιση των ινιδίων ακτίνης. Παράλληλα, η νεφρίνη αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό ακτίνης, και μέσω της ενδοκυττάριας σύνδεσής της με την ποδοσίνη και την CD2AP <sup>5</sup>.

Μετά την απομόνωση της νεφρίνης, ανακαλύφθηκε ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου της, του NPHS1, είναι η αιτία ανάπτυξης του Φιλανδικού τύπου νεφρωσικού συνδρόμου <sup>10</sup>. Η αδρανοποίηση του συγκεκριμένου γονιδίου προκαλεί μαζική πρωτεϊνουρία.

Η ποδοσίνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με MB 42 kDa με δομή που προσομοιάζει με φουρκέτα, με δυο ενδοκυττάρια καρβοξυτελικά άκρα. Η ποδοσίνη μαζί με τη νεφρίνη σχηματίζει διμερή και ολιγομερή, τα οποία ενισχύουν τη μεταβίβαση των χημικών σημάτων, ενώ ταυτόχρονα λειτουργεί ως ικρίωμα για τη στήριξή της. Παράλληλα, αλληλεπιδρά με τις ενδοκυττάριας περιοχές των πρωτεϊνών που προσομοιάζουν στη νεφρίνη (NEPH1, NEPH2, φιλτρίνη), αλλά και την ακτίνη του κυτταροσκελετού, μέσω της CD2AP <sup>5,9</sup>. Μετάλλαξη του γονιδίου NPHS2 προκαλεί κορτικοανθεκτικό νεφρωσικό σύνδρομο.

Η CD2AP είναι μια πρωτεΐνη του ΛΔ με MB 80 kDa που συνδέεται με το καρβοξυτελικό ενδοκυττάριο άκρο της νεφρίνης και τον κυτταροσκελετό των ποδικών προεκβολών. Παρατηρήθηκε αρχικά στα T-λεμφοκύτταρα, όπου έχει ρόλο ρυθμιστή του κυτταροσκελετού. Αλληλεπιδρά με την ακτίνη του κυτταροσκελετού άμεσα, αλλά και με τη μεσολάβηση μορίων, όπως η κορτακτάνη, η συναπτοποδίνη και η CapZ (actinfilament barbed end capping protein). Μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί την CD2AP προκαλεί σπειραματοσκλήρυνση στον άνθρωπο <sup>5,9</sup>.

### 2.2.2 ZO-1, FAT1 και P-καντχερίνη (P-cadherin)

Η πρωτεΐνη ZO-1 έχει MB 225 kDa και εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των μεσοκυττάρων συνδέσμων. Ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών MAGUK (membrane associated guanylate kinase). Αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά των διακυτταρικών συνδέσμων, όπως η οκλουντίνη (occludin), η  $\alpha$ -κατενίνη και η ZO-2 καθώς και με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η ακτίνη και σπεκτρίνη. Στα ποδοκύτταρα, η ZO-1 εκφράζεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια στα σημεία, όπου το ΛΔ εισχωρεί στην κυτταρική μεμβράνη<sup>9</sup>.

Οι FAT1, P-καντχερίνη και VE-καντχερίνη (vascular epithelium cadherin) είναι τρεις πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των καντχερινών. Η FAT1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με MB 500 kDa, ανήκει στην οικογένεια των πρώτο καντχερινών και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του εύρους του ΛΔ και στην ενίσχυση της προσκόλλησης των γειτονικών ποδικών προεκβολών. Η έλλειψή της έχει ως αποτέλεσμα την εξάλειψη των ποδικών προεκβολών με αποτέλεσμα την πρόκληση πρωτεϊνουρίας. Επίσης, είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του ΛΔ, τη συντήρηση του αρνητικού φορτίου της κορυφαίας περιοχής της κυτταρικής μεμβράνης και τον πολυμερισμό της ακτίνης. Η P-καντχερίνη, επίσης συμμετέχει στο σχηματισμό του ΛΔ, χωρίς να αποδειχθεί ότι η έλλειψή της επηρεάζει τη νεφρική λειτουργία<sup>5,9</sup>.

### 2.2.3 NEPH και Ντενσίνη

Μια οικογένεια πρωτεϊνών που παρουσιάζει ομοιότητες με τη νεφρίνη είναι αυτή που περιλαμβάνει τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, NEPH1, NEPH2 και τη φιλτρίνη (NEPH3). Αυτή η οικογένεια των πρωτεϊνών σχηματίζει ομοδιμερή. Η NEPH1 και NEPH2 αλληλεπιδρούν με το εξωκυττάριο τμήμα της νεφρίνης, ενώ ο συνδυασμός της νεφρίνης με το τη NEPH1, προάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης. Η φιλτρίνη η οποία περιγράφηκε πρόσφατα και η έκφραση της οποίας είναι μειωμένη σε ασθενείς με σπειραματοπάθειες σε βιοψίες νεφρού ίσως να σχετίζεται με την παθογένεια πρωτεϊνουρικών σπειραματοπαθειών<sup>5</sup>.

Η ντενσίνη αποτελείται από 1495 αμινοξέα με MB 167 kDa. Ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών LAP από τα αρχικά LRR και PDZ καθώς περιέχει τμήματα LRR και

PDZ. Τα LRR (leucine reach repeats) διαδραματίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών, ενώ τα PDZ τμήματα οργανώνουν και συνδέουν τις πρωτεΐνες αυτές σε συμπλέγματα στην κυτταρική μεμβράνη. Ακόμα, η ντενσίνη περιέχει και ένα τμήμα τύπου βλεννίνης και ένα RGD τριπεπτίδιο το οποίο αποτελείται από Arg-Gly-Asp και το οποίο περιγράφηκε αρχικά στη φιμπρονεκτίνη ως υπεύθυνο για τη σύνδεσή της με την κυτταρική μεμβράνη. Αργότερα παρατηρήθηκε και σε άλλες πρωτεΐνες οι οποίες δεν έχουν σχέση με την κυτταρική πρόσφυση <sup>12</sup>.

## **2.3 Οι πρωτεΐνες της κορυφαίας (αυλικής) επιφάνειας**

### **2.3.1 Ποδοκαλυξίνη και εζρίνη**

Η ακτίνη στην κορυφαία επιφάνεια των ποδικών προσεκβολών συνδέεται με διαμεμβρανικά μόρια που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία του αρνητικού φορτίου των ποδοκυττάρων. Η ποδοκαλυξίνη αποτελεί την κύρια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη. Το μόριο της είναι γλυκοζυλιωμένο με υδατάνθρακες και είναι πλούσιο σε θεικές ομάδες και σιαλικό οξύ. Στο σιαλικό οξύ οφείλεται το έντονο αρνητικό της φορτίο, το οποίο εξυπηρετεί όχι μόνο την απόθεση των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών του πλάσματος, αλλά και την απόθεση των ποδικών προσεκβολών, ώστε να σχηματίζεται η σχισμή διήθησης <sup>13</sup>.

Η εζρίνη συνδέει το κυτταροπλασματικό τμήμα της ποδοκαλυξίνης με τον κυτταροσκελετό. Ανήκει στην οικογένεια των συνδετικών πρωτεϊνών ERM (ezrin/radixin/moesin) οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για τη διατήρηση της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων <sup>14</sup>.

### **2.3.2 NHERF2 και μεγκαλίνη**

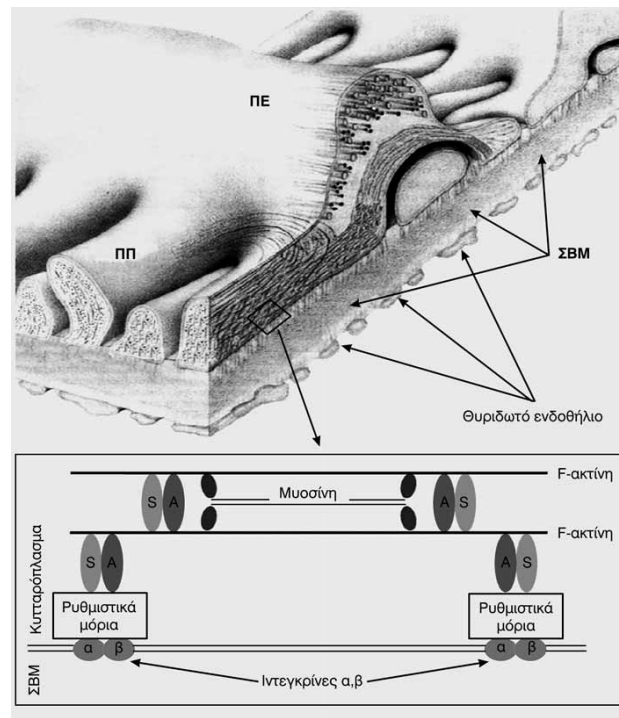
Ο ρυθμιστικός παράγοντας του ανταλλάκτη  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHERF2) είναι το δεύτερο μόριο του συμπλέγματος και συνδέεται μέσω PDZ επαναλήψεων με το  $\text{NH}_2$ -άκρο της φωσφορυλιωμένης σε Tyr567 εζρίνης. Η χορήγηση πρωταμίνης, σιαλικού οξέος ή πουρομυκίνης σε αρουραίους προκαλεί την αποφωσφορυλίωση της εζρίνης και την αποσύνδεση του συμπλέγματος από τον κυτταροσκελετό <sup>9</sup>.



Η μεγαλίνη, ή γλυκοπρωτεΐνη 330 (gp330) είναι μια άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη και θεωρείται υπεύθυνη για την ενδοκυττάρωση ποικίλων μορίων. Η μεγαλίνη συνδέεται στο κυτταροσκελετό μέσω της Mag1. Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών MAGUK, οι οποίες αποτελούν ενδοκυττάρια πρωτεΐνες συγκέντρωσης, οργάνωσης και οριοθέτησης άλλων πρωτεϊνών πάνω στην κυτταρική μεμβράνη. Η Mag1 συνδέεται με το κυτταροσκελετό, μέσω της συναπτοποδίνης και της α-ακτινίνης 4<sup>15</sup>.

#### **2.4 Πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης και ο ρόλος τους**

Η βασική περιοχή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των ποδοκυττάρων συνδέεται με τη ΣΒΜ μέσω δυο ομάδων συμπλόκων προσκόλλησης, των ιντεγκρινών και των δυστρογλυκανών. Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς διαμεμβρανικοί υποδοχείς που προσκολλώνται στα συστατικά της ΣΒΜ (λαμινίνη 11, κολλαγόνο τύπου IV). Η ιντεγκρίνη α3β1 είναι απαραίτητη για την ωρίμανση των ποδοκυττάρων, καθώς η έλλειψή της προκαλεί εξάλειψη των ποδικών προεκβολών σε πειραματόζωα, ενώ η χορήγηση αντι-α3β1 αντισωμάτων σε τρωκτικά προκαλεί εξάλειψη των ποδικών προεκβολών, αποκόλληση των ποδοκυττάρων από τη βασική μεμβράνη και πρωτεϊνουρία<sup>16</sup>. Οι ιντεγκρίνες συνδέουν λειτουργικά τη ΣΒΜ με τον κυτταροσκελετό μέσω της αλληλεπίδρασής τους με μια ομάδα κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, οι οποίες συνδέονται με την ακτινίνη (παξιλίνη, ταλίνη, βινκουλίνη, ακτινίνη 4). Με αυτόν τον τρόπο, ρυθμίζουν τη δυναμική της ακτίνης του κυτταροσκελετού, και ταυτόχρονα τροποποιούν τις συγκολλητικές τους ιδιότητες ανάλογα με τα ενδοκυττάρια ερεθίσματα<sup>17</sup> (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5.** Σχηματική απεικόνιση του κυτταροσκελετού ακτίνης και της αλληλεπίδρασης του με τη βασική μεμβράνη. *S*: Συναπτοποδίνη, *A*:  $\alpha$ -Ακτινίνη 4, *ΠΠ*: ποδικές προεκβολές, *ΠΕ*: Πρωτογενής εκβλάστηση. Από: Blattner & Kretzler, 2005

Η ΣΒΜ, εκτός των ιντεγκρινών συνδέεται με τον κυτταροσκελετό των ποδικών προσεκβολών, μέσω των  $\alpha$ - και  $\beta$ - δυστρογλυκανών, οι οποίες αρχικά, είχαν περιγραφεί ως κύρια συστατικά των μυϊκών ινών. Η  $\alpha$ -δυστρογλυκάνη συνδέεται με τη λαμινίνη και την αγρίνη της ΣΒΜ, ενώ η  $\beta$ -δυστρογλυκάνη συνδέεται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού, μέσω της ουτροφίνης<sup>18</sup>. Οι δυστρογλυκάνες συμβάλλουν στο σχηματισμό της βασικής επιφάνειας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στα έμβρυα και στην τοποθέτηση κάποιων πρωτεϊνών στη ΣΒΜ. Επίσης, καθοριστικός είναι ο ρόλος τους στην οργάνωση της επιφάνειας του κυττάρου η οποία συνδέεται με τη λαμινίνη<sup>19</sup>.

### 2.4.1 Κινάση συνδεδεμένη με ιντεγκρίνη (Integrin Linked Kinase-ILK)

Η ILK είναι μια σερίνη-θρεονίνη κινάση, η οποία συνδέεται με το κυτταροπλασματικό άκρο της β1-ιντεγκρίνης. Σε τρία μοντέλα σπειραματικής πρωτεϊνουρικής βλάβης (CNF, antiGBM, ΕΤΣΣ) έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση του mRNA της ILK στα ποδοκύτταρα <sup>20</sup>. Το μόριο της ILK διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη σύνδεση της ιντεγκρίνης με τα νημάτια της ακτίνης. Φαινοτυπικά προκαλεί αλλαγή των ποδοκυττάρων από διαφοροποιημένα κύτταρα με εκβλαστήσεις σε αδιαφοροποίητα κύτταρα χωρίς εκβλαστήσεις και χωρίς ΛΔ. Ακόμα, συμμετέχει στην επικοινωνία μεταξύ της βασικής (ιντεγκρίνη-BM) και της πλαγίας επιφάνειας των ποδικών εκβλαστήσεων προκαλώντας αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού <sup>21</sup>.

## 2.5 Κυτταροσκελετός ποδοκυττάρων

### 2.5.1 Λειτουργίες κυτταροσκελετού

Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες του κυτταροσκελετού είναι η ανάγκη διατήρησης του σταθερού εύρους των ΣΔ και της συνάφειας των ποδικών προσεκβολών με τη ΣΒΜ. Καθώς, η σπειραματική διήθηση είναι μια δυναμική διεργασία, προϋποθέτει τη παρουσία ισχυρών δυνάμεων προσκόλλησης, ικανότητα συνεχούς αναπροσαρμογής της μορφής των ποδικών προσεκβολών, αλλά και ελαστικότητα για την προσαρμογή τους στις μεταβολές της υδραυλικής τάσης των σπειραματικών τριχοειδών <sup>5</sup>.

Η σημασία του κυτταροσκελετού καθίσταται σαφής κατά τη διάρκεια της σπειραματογένεσης, καθώς τα επιθηλιακά προγονικά κύτταρα, από τα οποία προκύπτουν τα ποδοκύτταρα, σταδιακά αποκτούν φαινότυπο μεσεγχυματικών κυττάρων, εκφράζοντας μόρια όπως η βιμεντίνη, η οποία αποτελεί συστατικό των πλούσιων σε ακτίνη μικροϊνιδίων του κυτταροσκελετού των ποδικών προσεκβολών <sup>5</sup>.

### 2.5.2 Δομικές μονάδες του κυτταροσκελετού

Η βασική μονάδα των μικροϊνιδίων ακτίνης είναι η G-ακτίνη (Globular actin), η οποία πολυμερίζεται, σχηματίζοντας ινίδια F-ακτίνης (Filamentous actin). Η F-ακτίνη βρίσκεται σε μια συνεχή δυναμική ισορροπία αποδόμησης και πολυμερισμού, μεταβάλλοντας το μήκος της διαρκώς. Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού

μικροσκοπίου, έχει αποδειχθεί ότι η ακτίνη συνδέεται και αλληλεπιδρά με μια σειρά μορίων, όπως είναι η μυοσίνη II, η α-ακτινίνη 4 και η συναπτοποδίνη, μόρια τα οποία σταθεροποιούν τον κυτταροσκελετό και τον προσδένουν στην κυτταρική μεμβράνη, μέσω της βινκουλίνης και της ταλίνης<sup>22</sup>.

Η συναπτοποδίνη είναι μια πλούσια σε προλίνη πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται τόσο στα ζώα, όσο και στον άνθρωπο, σε εξειδικευμένα κυτταρικά διαμερίσματα, όπως είναι οι δενδρίτες των νευρώνων και οι ποδικές προσεκβολές των ποδοκυττάρων<sup>23</sup>. Ρυθμίζει τη δημιουργία δεσμίδων F-ακτίνης, μέσω της αλληλεπίδρασης της με την α-ακτινίνη 4. Επίσης, συνδέει λειτουργικά τις πρωτεΐνες της βασικής επιφάνειας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και της ΣΔ με τον κυτταροσκελετό. Η έλλειψη της συναπτοποδίνης, προκαλεί ανωμαλίες στη κατασκευή του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων και αναστολή της κυτταρικής μετανάστευσης, γεγονός που τονίζει το ρόλο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στη ρύθμιση της συσταλτικής δυναμικής των μικροϊνιδίων ακτίνης<sup>24</sup>.

Η α-ακτινίνη 4 είναι μια πρωτεΐνη που συνδέεται τόσο με την F-ακτίνη, όσο και με τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης. Προάγει τη μορφοποίηση των δεσμίδων της F-ακτίνης του κυτταροσκελετού, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται ότι η δράση της ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση του ενδοκυττάρου ασβεστίου<sup>25</sup>. Το ασβέστιο μαζί με τη Rho κινάση ρυθμίζουν την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού με ελάττωση του μεγέθους του κυτταρικού σώματος, λέπτυνση των πρωτογενών προσεκβολών και αύξηση των ινιδίων καταπόνησης της ακτίνης στις δευτερογενείς προσεκβολές, μετά την εφαρμογή μηχανικού στρες σε καλλιέργειες. Η Rho κινάση ανήκει στις μικρές GTPases, οι οποίες ρυθμίζουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού και σχηματίζει δέσμες με τα ινίδια της ακτίνης<sup>26</sup>.

Μεγάλος αριθμός φωσφατασών έχει ανιχνευθεί σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων μεταξύ των οποίων και η σπειραματική επιθηλιακή πρωτεΐνη (GLEPP1). Ο ρόλος των ποδοκυτταρικών φωσφατασών στην οργάνωση του κυτταροσκελετού παραμένει ως επί το πλείστον άγνωστος. Η GLEPP-1 είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη των ποδοκυττάρων η οποία έχει ιδιότητες τυροσινικής φωσφατάσης. Πιστεύεται ότι επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία του ποδοκυττάρου, ρυθμίζοντας το βαθμό της τυροσινικής φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών του<sup>27</sup>.

### 3. Ιδιοπαθής Μεμβρανώδης Σπειραματοπάθεια

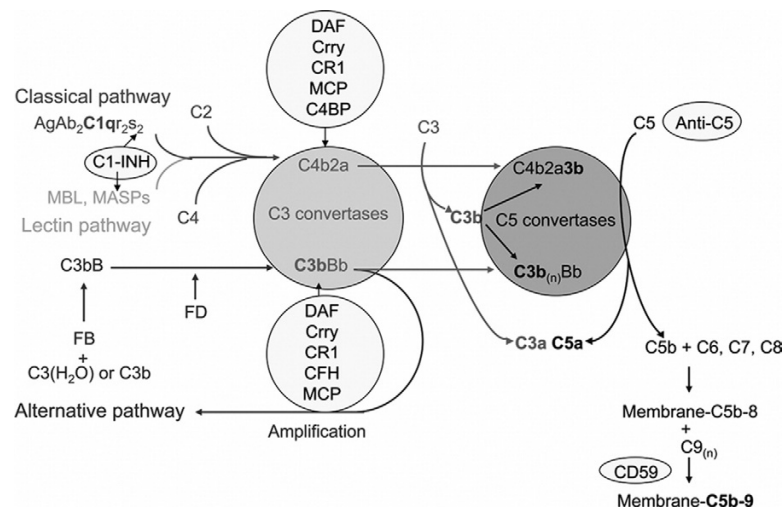
#### 3.1 Παθοφυσιολογία

Η ιδιοπαθής μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια είναι ένα αυτοάνοσο νόσημα, το οποίο χαρακτηρίζεται από υποεπιθηλιακές εναποθέσεις ανοσοσυμπλεγμάτων, οι οποίες εντοπίζονται μέσω ανοσοφθορισμού και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Επίσης υπάρχουν και δευτεροπαθείς μορφές στις οποίες είναι δυνατή η ανίχνευση κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων, σε αντίθεση με την ιδιοπαθή όπου αυτά σπάνια ανιχνεύονται στο πλάσμα του αίματος. Η εκτεταμένη μελέτη της παθοφυσιολογίας της ιδιοπαθούς μορφής της νόσου κατευθύνθηκε προς την ιδέα της αντίδρασης μεταξύ ενός αντισώματος, είτε με ένα κυκλοφορούν αντιγόνο που εμφυτεύεται στον υποεπιθηλιακό χώρο του σπειράματος, είτε με ένα ενδογενές σπειραματικό αντιγόνο<sup>30,31</sup>.

Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελεί σημαντικό τμήμα της έμφυτης ανοσίας η οποία προστατεύει τον άνθρωπο από μολυσματικούς μικροοργανισμούς καθαιρώντας τον από ανοσοσυμπλέγματα και νεκρά κύτταρα, και παράλληλα συνδέει το έμφυτο αμυντικό σύστημα με το προσαρμοζόμενο ανοσοποιητικό σύστημα. Το συμπλήρωμα μπορεί να ενεργοποιηθεί με τρεις οδούς μέσω α) της κλασσικής, β) της εναλλακτικής οδού και γ) της λεκτίνης που συνδέεται με μανόζη (MBL). Κάθε μια από αυτές τις οδούς έχει διαφορετική αφετηρία. Η κλασσική οδός ενεργοποιείται, όταν το C1 συνδέεται με τις ανοσοσφαιρίνες IgM ή IgG στα ανοσοσυμπλέγματα. Η ενεργοποίηση του C1 διασπά και το C4 και το C2, ώστε να δημιουργηθούν τα C4a/C4b και C2a/C2b. Το C4b2a δρα ως μετατροπέας του C3 ο οποίος διαιρείται και ενεργοποιεί το C3 (Εικόνα 6)<sup>30,31</sup>.

Η εναλλακτική οδός ενεργοποιείται αυθόρμητα μέσω της υδρόλυσης του C3, το οποίο δεσμεύει τον παράγοντα B (CFB). Από τη διάσπαση του παράγοντα D (CFD, αδιψίνη), σχηματίζεται ο μετατροπέας του C3 ο οποίος μπορεί να ενισχυθεί από μόνος του, για να σχηματιστεί το C3bBb (Εικόνα 6). Η ένωση του MBL με την τελική ομάδα των υδατανθράκων σε ορισμένα μικρόβια οδηγεί στην ενεργοποίηση της MBL οδού. Η ενεργοποίηση κάθε μιας οδού οδηγεί στη διάσπαση του C3 και του C5, και την παραγωγή των C3a και C5a αναφυλατοξινών, C3b οψονίνης και C5b για

να αρχίσει η μη ενζυμική συναρμοσμένη του C5b-9 συμπλόκου άμυνας της μεμβράνης (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6.** Το σύστημα του συμπληρώματος. Το σχήμα απεικονίζει την εμφάνιση τριών διαφορετικών οδών και τους κοινούς ενδιάμεσους, τους μετατροπείς C3 και C5. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρυθμιστικός ρόλος μορίων όπως ο DAF, το Crry και ο παράγων H στην ρύθμιση της ενεργοποίησης του C3 και C4 παράγοντα του συμπληρώματος. Από: Bao & Quigg, 2007

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν το σύστημα του συμπληρώματος δρουν μέσω ειδικών κυτταρικών υποδοχέων: την πρωτεΐνη G η οποία συνδέεται με τους υποδοχείς C3a και C5a (C3aR και C5aR) και τους υποδοχείς του συμπληρώματος 1-4 (CR1-4) για τα C3b, iC3b, and C3dg. Οι τελευταίες δυο πρωτεΐνες αποτελούν προϊόντα των παραγόντων I (CFI) (CD35), (CFH) και του CD46 (MCP ή μεμβρανικό συμπαράγοντα ρύθμισης του συμπληρώματος) που εκφράζεται στην μεμβράνη. Το C1q έχει πολλούς σημαντικούς ρόλους. Η πρωτεΐνη CD93 η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων κάποια στιγμή θεωρήθηκε ότι αποτελεί εξειδικευμένο υποδοχέα του C1q (C1qR), αλλά στη συνέχεια, η θεωρία αυτή δεν επιβεβαιώθηκε. Άλλοι υποδοχείς οι οποίοι αφορούν το ανοσοποιητικό σύστημα είναι οι gC1qR (globular) και cC1qR (calreticulin) και σχετίζονται με τη δράση των ουδετερόφιλων και των μονοκύτταρων-μακροφάγων. Επίσης, θεωρείται ότι έχουν επίδραση και σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα B και τα T λεμφοκύτταρα και μπορεί να αποτελούν τις τοπικές γραμμές άμυνας

για ορισμένα όργανα όπως τα νεφρά. Τα επιθηλιακά κύτταρα του σπειράματος εκφράζουν C3aR and CR1<sup>32</sup>.

Οι παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος στον άνθρωπο εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 1q3.2 ενώ στα ποντίκια στο χρωμόσωμα 1 και περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη συμπάραγοντα της μεμβράνης (MCP), το CR1, τον παράγοντα επιτάχυνσης της φθοράς (DAF, CD55), την πρωτεΐνη C4b και τον CFH. Αυτές οι πρωτεΐνες αναστέλλουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τα θραύσματα του C3 και του C4. Στο τέλος του καταρράκτη του συμπληρώματος εμφανίζονται ο αναστολέας C1 (C1-INH) και το CD59, το οποίο αναστέλλει την ενεργοποίηση του C1 και το σχηματισμό του C5b-9, αντίστοιχα<sup>32</sup>.

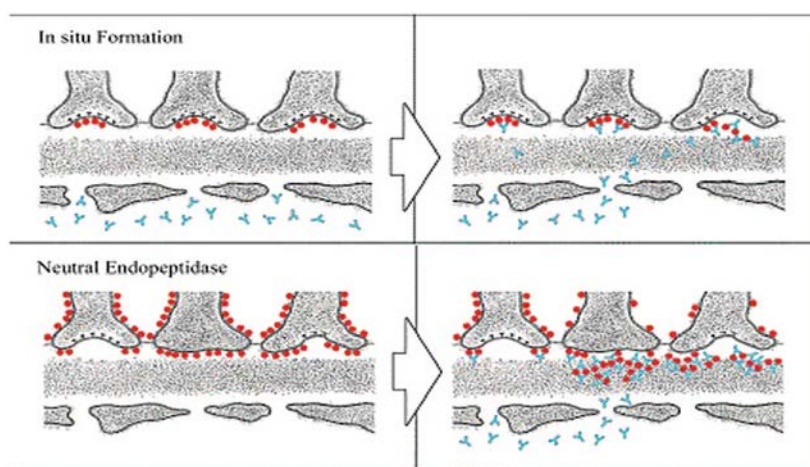
Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος είναι χαρακτηριστικό εύρημα της μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας αλλά εμφανίζεται και σε μια μεγάλη ποικιλία νεφρικών νοσημάτων, όπως είναι ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ), η IgA νεφροπάθεια και η διαβητική νεφροπάθεια<sup>30,31,32</sup>.

### 3.1.1 Μελέτες σε ζώα

Πολλές από τις σύγχρονες αντιλήψεις για την παθοφυσιολογία της νόσου, έχουν προκύψει από τη μελέτη της νεφρίτιδας του Heymann, η οποία αποτελεί τη πειραματική αναπαραγωγή της μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας σε αρουραίους. Αυτή η νεφροπάθεια μοιάζει λειτουργικά και μορφολογικά με τη μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια στον άνθρωπο. Το καθιερωμένο μοντέλο που προκύπτει από την ανοσοποίηση των αρουραίων Lewis οφείλεται σε διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στις πρωτεΐνες της κορυφαίας επιφάνειας των ποδοκυττάρων. Τα ανοσοσυμπλέγματα σχηματίζονται από την αντίδραση αντιγόνων των πρωτεϊνών της κορυφαίας επιφάνειας με τα αντίστοιχα αντισώματα. Μελέτες *in situ* απέδειξαν την παρουσία ειδικών αντιγονικών ομάδων που επικάθονταν στο τοίχωμα των τριχοειδών του σπειράματος<sup>30,31</sup>.

Ο αντιγονικός επίτοπος σε αυτό το μοντέλο μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας εντοπίστηκε από τους Kerjaschki και Farquahar και ονομάστηκε μεγκαλίνη. Ο υποδοχέας μεγκαλίνη ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των LDL-υποδοχέων και

συνδέεται με την κλαθρίνη αποκλειστικά στις ποδικές προσεκβολές των ποδοκυττάρων. Σε μοριακό επίπεδο, έχει καθοριστεί η ακριβής αλληλουχία των αμινοξέων που δρα ως παθολογικός αντιγονικός προσδιοριστής και αποτέλεσε την πρώτη απόδειξη ότι τα ποδοκύτταρα συμμετέχουν ενεργά στο σχηματισμό του σπειραματικού ανοσοσυμπλέγματος στη μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια (Εικόνα 7). Η διαρκής αύξηση της εναπόθεσης των ανοσοσυμπλεγμάτων φαίνεται ότι απαιτεί τη *de novo* σύνθεση μεγακάλινης από τα ποδοκύτταρα, η οποία φαίνεται να μεταφέρεται μέσω κυστιδίων στη κυτταροπλασματική μεμβράνη στη βάση των ποδικών προσεκβολών με την οποία τελικά συγχωνεύεται <sup>31</sup>.

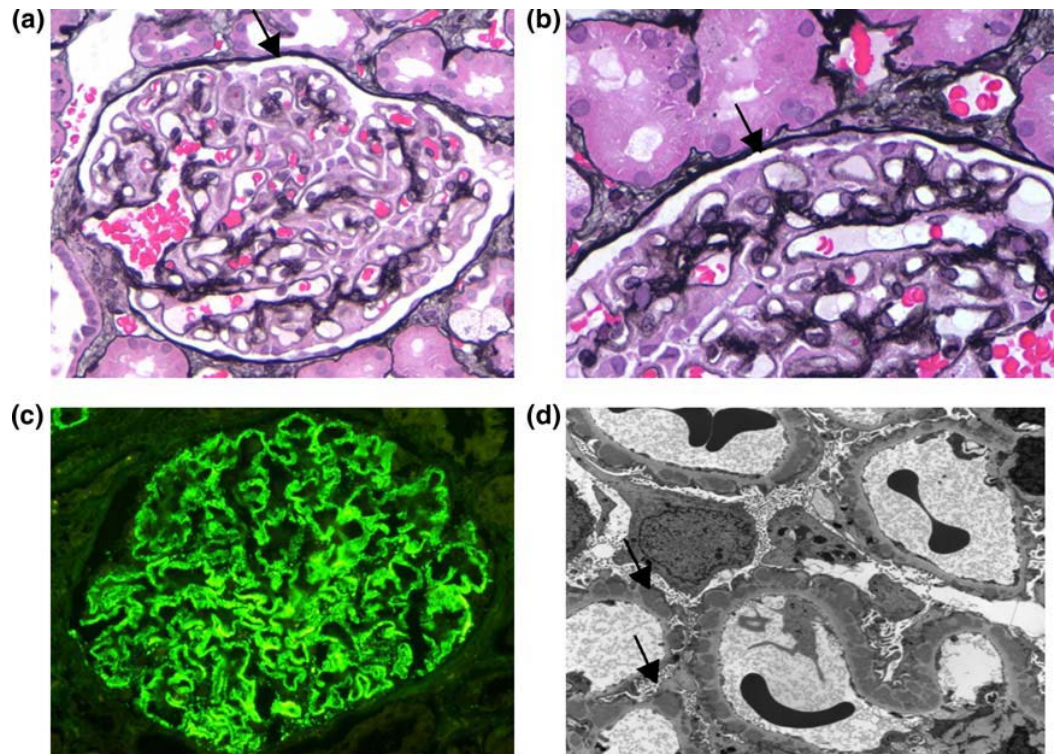


**Εικόνα 7.** Σχηματισμός *in situ* του ανοσοσυμπλέγματος σε δυο τύπους μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας. Και στις δυο περιπτώσεις, τα παθολογικά αντιγόνα είναι πρωτεΐνες της μεμβράνης των ποδοκυττάρων. Πάνω. Στη νεφρίτιδα του Heymann, τα αντιγόνα (μεγακάλινη) είναι οι κόκκινες κουκίδες και τα αντισώματα που καταφθάνουν από την κυκλοφορία είναι IgG. Τα δυο αυτά μόρια αντιδρούν μεταξύ τους στην μεμβράνη των ποδοκυττάρων και στη συνέχεια επικάθονται στη βασική μεμβράνη του σπειράματος. Κάτω. Στην εμβρυϊκή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια, οι ουδέτερες ενδοπεπτιδάσες (κόκκινες κουκίδες) είναι τα παθολογικά αντιγόνα. Τα αντισώματα προέρχονται από την μητέρα τα οποία περνούν τον πλακούντα και σχηματίζουν ανοσοσυμπλέγματα στα ποδοκύτταρα, όμοια με εκείνα που παρατηρούνται στη μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια. Από: Ronco and Debiec, 2005

Η δημιουργία ανοσοσυμπλέγματος μεγακάλινης και IgG έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου C5b-9 επίθεσης, την εξάλειψη των ποδικών προσεκβολών με συνέπεια την πρωτεϊνουρία. Επίσης παρατηρείται εμφάνιση παραγόντων φλεγμονής, μείωση του αριθμού των ποδοκυττάρων και αλλαγές στο



ΛΔ<sup>33</sup> (Εικόνα 8). Η πάχυνση της βασικής μεμβράνης η οποία συνοδεύεται από απουσία κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή από ελάχιστο αποτελεί το πρώιμο ιστολογικό της εύρημα<sup>31</sup>.



*Drug Discovery Today: Disease Models*

**Εικόνα 8.** Παθολογοανατομία μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας στον άνθρωπο. Α. Τα πρώιμα στάδια, κατά τα οποία το σπείραμα φαίνεται φυσιολογικό. Με την εξέλιξη της νόσου παρατηρείται πάχυνση της βασικής μεμβράνης (400x) Β. Η χρώση αργύρου με μεθenaμίνη δείχνει τις χαρακτηριστικές αιχμές (βέλη), οι οποίες αντιστοιχούν στη προβολή της βασικής μεμβράνης ανάμεσα από την εναπόθεση των ανοσοσυμπλεγμάτων (1000x) C. Ο ανοσοφθορισμός αποκαλύπτει την εναπόθεση της IgG με υποεπιθηλιακή κατανομή της ΣΒΜ D. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκαλύπτει τις χαρακτηριστικές υποεπιθηλιακές εναποθέσεις ανοσοσυμπλεγμάτων (βέλη). Από: Jefferson et al, 2010

Άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες εκφράζονται στη μεμβράνη των ποδοκυττάρων και δρουν ως αντιγόνα για τα κυκλοφορούντα αντισώματα στα ποντίκια και στα κουνέλια, είναι η διπεπτιδυλπεπτιδάση IV (DPPIV), η NEP και η αμινοπεπτιδάση Α. Η DPPIV και η NEP εκφράζονται και στα ποδοκύτταρα του ανθρώπου και υπήρχε η εντύπωση ότι

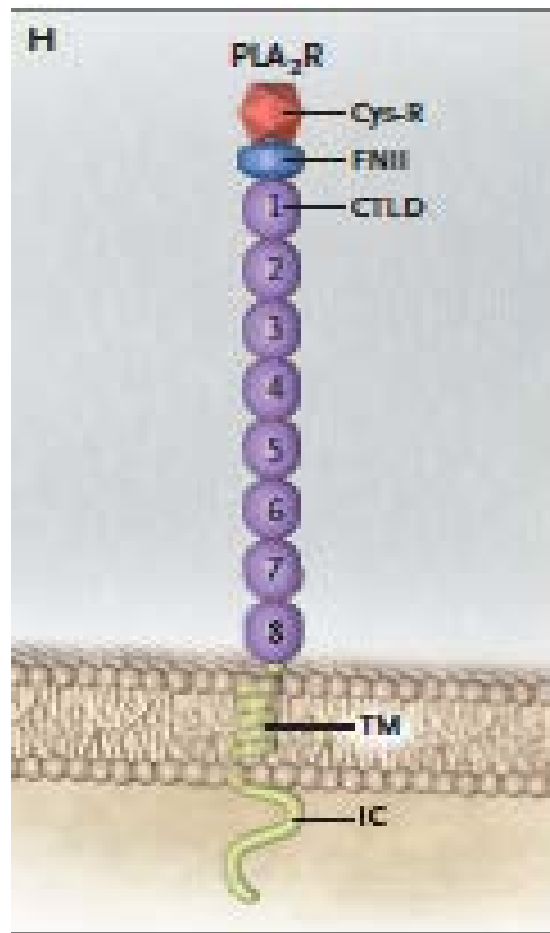
διαδραμάτιζαν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας<sup>33</sup>.

### 3.1.2 Μελέτες στον άνθρωπο

Αν και οι έρευνες σε ζώα απέδειξαν το ρόλο της μεγκαλίνης στη πρόκληση της νεφρίτιδας του Heymann, στον άνθρωπο δεν παρατηρήθηκε αυτό το υποεπιθηλιακό αντιγόνο στα ποδοκύτταρα. Η παρουσία όμως της μεγκαλίνης στα πειραματόζωα αποτέλεσε οδηγό προσέγγισης της παθοφυσιολογίας της νόσου και την αναζήτηση αντίστοιχων αντιγονικών επιτόπων στον άνθρωπο.

Αρχικά το 2002 ο Debiec και συν περιέγραψαν μια μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί την ουδέτερη ενδοπεπτιδάση, ο οποίος μεταφέρεται από την μητέρα στο νεογνό και είναι υπεύθυνος για την ανοσολογικού τύπου αντίδραση τύπου αντιγόνου-αντισώματος, και την πρόκληση νεογνικής μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας. Σε μελέτες που έγιναν σε ετερόκλητους πληθυσμούς βρέθηκε ότι υπεύθυνο για αυτή την μετάλλαξη ήταν το MME γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την ουδέτερη ενδοπεπτιδάση.

Επανάσταση στη παθοφυσιολογία της μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας αποτέλεσε η ανακάλυψη της γλυκοπρωτεΐνης PLA2R1, η οποία είναι ο υποδοχέας του τύπου-M της φωσφολιπάσης A2 και έχει μοριακό βάρος 185 kD (Εικόνα 9). Η PLA2R1 είναι το πρώτο αντιγόνο το οποίο περιγράφηκε σε ενήλικες με ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια<sup>34,35</sup>. Παρόλα αυτά ανιχνεύεται και σε φυσιολογικά σπειράματα, στα λεμφοκύτταρα και στον πνεύμονα.



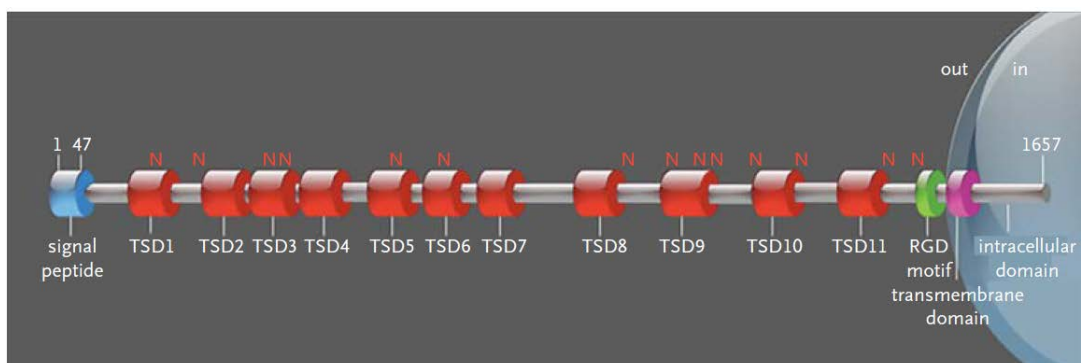
**Εικόνα 9.** Δομή της γλυκοπρωτεΐνης PLA2R1. N-τελικό άκρο (Cys-R), περιοχή φμπρονεκτίνης II (FNII), 8 CTLD's, διαμεμβρανικό σκέλος (TM) και ένα C-τελικό ενδοκυττάριο (IC) Από: Beck et al, 2009

Οι Beck και συν (2009), διαπίστωσαν ότι το 70% των ασθενών με ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια εξέφραζαν στα ποδοκύτταρα τους την γλυκοπρωτεΐνη PLA2R1. Η γλυκοπρωτεΐνη δεν εκφραζόταν σε ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από δευτεροπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια ή άλλες σπειραματικές νόσους. Η φασματοσκοπία μάζας, στη συνέχεια, έδειξε ότι αυτή η γλυκοπρωτεΐνη ήταν η πρωτεΐνη M-τύπου PLA2R, ένας τύπος 1 διαμεμβρανικού υποδοχέα της οικογένειας της μανόζης, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια του σπειράματος των ποδοκυττάρων. Τα ποδοκύτταρα είναι κύτταρα του σπειράματος που εκφράζουν την PLA2R, αν και έκφραση της έχει παρατηρηθεί και στους πνεύμονες και στα λευκοκύτταρα, όπως έχει προαναφερθεί<sup>34</sup>.

Τα αντισώματα της PLA2R είναι IgG αυτοαντισώματα κυρίως IgG4, αλλά και σε μικρότερο ποσοστό IgG1 (Εικόνα 11). Η σύνδεση των κυκλοφορούντων

αντισωμάτων IgG4 με τα αντιγόνα PLA2R στα ποδοκύτταρα δημιουργεί υποεπιθηλιακά ανοσοσυμπλέγματα *in situ*, τα οποία δεν παρατηρούνται σε περιπτώσεις δευτεροπαθούς μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας ή σε άλλες αυτοάνοσες παθήσεις. Η PLA2R και τα IgG4 αντισώματα συνεντοπίζονται υποεπιθηλιακά σε ασθενείς με ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια. Πιθανολογείται ότι για την έναρξη της βλάβης στο σπείραμα εκτός από τα αντισώματα IgG4 απαιτείται και η παρουσία IgG1 αντισωμάτων. Η μανόζη λεκτίνης καθώς και άλλα μονοπάτια που σχετίζονται με τα IgG4 μπορεί να ενεργοποιηθούν. Η έναρξη της ανοσολογικής απάντησης κινητοποιεί ένα καταρράκτη διάδοσης των ανοσολογικών επιτόπων, όπου η ανοσολογική απάντηση στα μη PLA2R αντιγόνα στα ποδοκύτταρα ενδέχεται να επιτρέπει τη διασταυρούμενη σύνδεση τους με αντισώματα, με συνέπεια και αυτά να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την πυροδότηση αλλαγών στις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και της σχισμής διήθησης<sup>37</sup>.

Το 2014 η ομάδα του Tomas περιέγραψε ένα 2<sup>ο</sup> μόριο με ανάλογα χαρακτηριστικά με αυτά του PLA2R το οποίο έχει μοριακό βάρος 250kd και ονομάζεται θρομβοσποντίνη (THSD7A) τύπου 1 7A (εικόνα 10)<sup>38</sup>.

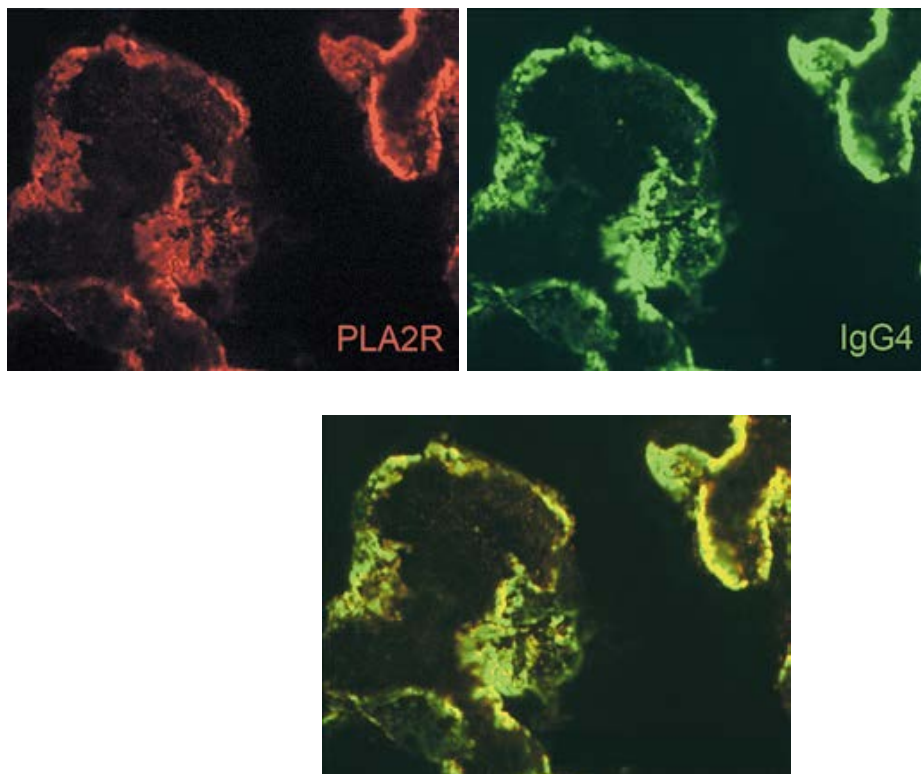


**Εικόνα 10.** Η εικόνα δείχνει την αρχιτεκτονική δομή της THSD7A, με μια μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή αποτελούμενη από 11 TSD κομμάτια, 14 περιοχές γλυκοζυλίωσης(N) και 1 αργινίνη-γλυκίνη-ασπαρτικό οξύ (RGD) σύνδεση, μια μικρή διαμεμβρανική και μια ενδοκυττάρια ουρά. Από Tomas *et al*, 2014

Σε μια μελέτη 44 ευρωπαίων και 110 κατοίκων της Βοστώνης σε 6 και 9 αντίστοιχα ασθενείς με ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια, οι οποίοι δεν εξέφραζαν

PLA2R, ανιχνεύτηκε ο THSD7A υποεπιθηλιακά. Το μόριο αυτό εντοπίζεται στη σχισμή διήθησης, παρουσιάζει συνεντόπιση με την IgG4 και εξαφανίζεται με την υποστροφή της πρωτεϊνουρίας. Αντίθετα δεν ανιχνεύεται στον ορό γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της *in situ* δημιουργίας του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος<sup>38,39</sup>.

Υπάρχει προβληματισμός για την παθογένεια της ιδιοπαθούς μεμβρανώδους για το υπόλοιπο περίπου 20% των ασθενών που δεν ανιχνευόταν στον ορό τα αντισώματα anti-PLA2 ή anti-THSD7A. Οι πιθανές απαντήσεις είναι ότι η ευαισθησία της μεθόδου να είναι χαμηλή. Άλλη πιθανότητα είναι ότι η ιδιοπαθής μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια να είναι μια ετερογενής νόσος με πολλές φάσεις ανοσολογικής δραστηριότητας, ως εκ τούτου μπορεί κατά τη στιγμή της μελέτης να μην παρουσιαζόταν ενεργός ανοσολογική διέγερση. Επιπρόσθετα, μπορεί εκτός από την PLA2R και του THSD7A να υπάρχουν και άλλα αντιγόνα, τα οποία προκαλούν την νόσο, όπως είναι η αναγωγή της αλδόζης, το μιτοχondριακό υπεροξειδίο της δισμουτάσης και η α-ενολάση<sup>40,41</sup>.



**Εικόνα 11.** Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε ασθενή με μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια. Οι πάνω εικόνες απεικονίζουν τα PLA2R1 (αριστερά) και τα αντισώματα IgG4 (δεξιά) και την εναπόθεση αυτών στη βασική μεμβράνη του σπειράματος (κάτω). Από: Beck et al, 2009

Σε μελέτη των Stanescu και συν (2011) σε καυκάσιους, παρατηρήθηκε η συσχέτιση της ιδιοπαθούς μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας με γενετικούς πολυμορφισμούς του PLA2R1 και του συστήματος HLA. Παρατηρήθηκε ότι το αλληλόμορφο rs4664308 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2q24 και κωδικοποιεί του υποδοχέα PLA2R1 συνυπάρχει με το αλληλόμορφο rs2187668 στο χρωμόσωμα 6p21 που κωδικοποιεί το σύμπλοκο HLA (Human Leukocyte Antigen) της τάξης II HLA-DQ άλφα αλυσίδας 1 (HLA-DQA1). Αντίστοιχες συσχετίσεις του rs4664308 έχουν γίνει και με άλλους γενετικούς πολυμορφισμούς του χρωμοσώματος 6p21 όπως τα αλληλία rs3792189, rs3792192, rs9273327 και rs9272197 τα οποία όμως παρουσιάζουν περιορισμένη γεωγραφική κατανομή. Φαίνεται λοιπόν ότι ποικίλοι πολυμορφισμοί του HLA συσχετίζονται με την ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια και ότι μεταλλαξιόγονοι παράγοντες μπορούν να τροποποιήσουν την εξωκυττάρια πρωτεϊνική περιοχή του PLA2R1<sup>36</sup>.

Οι Debiec και Ronco (2011) εξέτασαν την παρουσία των PLA2R αντισωμάτων στον ορό και στα ανοσοσυμπλέγματα του σπειράματος σε 42 ασθενείς και παρατήρησαν ότι ορισμένοι ασθενείς δεν είχαν κυκλοφορούντα PLA2R αυτοαντισώματα και ότι η απουσία PLA2R αντισωμάτων δεν αποκλείει την παρουσία PLA2R υποεπιθηλικών ανοσοσυμπλεγμάτων σε με μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια. Επίσης παρατηρήθηκε σε τρεις ασθενείς υψηλές συγκεντρώσεις PLA2R αντισωμάτων στον ορό και απουσία ανοσοσυμπλεγμάτων στο σπείραμα. Πιθανή εξήγηση είναι ότι αυτά τα αντισώματα δεν προκαλούν βλάβη στο σπείραμα ή ότι τα ανοσοσυμπλέγματα αυτά δεν έχουν πρόσβαση στους ιστούς<sup>42</sup>.

Οι Beck και Salant (2010) υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η παρουσία των αντισωμάτων PLA2R στον ορό συσχετίζεται με την ενεργό ανοσολογική φάση της ιδιοπαθούς μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας και ότι η υπολειπόμενη πρωτεϊνουρία αποτελεί το αποτέλεσμα της εξέλιξης της νόσου, καθώς τα υποεπιθηλιακά ανοσοσυμπλέγματα χρειάζονται χρόνο για να αποδομηθούν. Η πρωτεϊνουρία στην ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια χωρίς την παρουσία αντισωμάτων μπορεί να οφείλεται στη συσσωρευμένη δομική καταστροφή των ποδοκυττάρων, η οποία χαρακτηρίζεται από την εξάλειψη των ποδικών προσεκβολών<sup>43</sup>.

Υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ του τίτλου των αντισωμάτων PLA2R και του βαθμού της πρωτεϊνουρίας. Τα αντισώματα PLAR2 μπορούν να εντοπιστούν και σε ασθενείς με ηπατίτιδα Β, ΣΕΛ, καρκίνο και σαρκοείδωση αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό<sup>42</sup>. Η πρόσφατη αναγνώριση των αντισωμάτων PLA2R πριν και μετά τις μεταμοσχεύσεις στις περιπτώσεις μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας ρίχνει περισσότερο φως στον ρόλο τους, και αναγνωρίζει μια υποομάδα πληθυσμού που βρίσκεται σε κίνδυνο απώλειας του μοσχεύματος. Παρά όλα αυτά απαιτείται επέκταση της έρευνας για να αξιολογηθεί η σχέση του HLA συστήματος ιστοσυμβατότητας, με το γονότυπο του PLA2R στο δότη και στο δέκτη, η σύνθεση του ανοσολογικού προφίλ και η λεπτομερής ανάλυση των αντισωμάτων έναντι του PLA2R για να καθοριστεί ο ρόλος του στις μεταμοσχεύσεις νεφρού.

### **3.2 Θεραπείες μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας**

Η αντιμετώπιση της ιδιοπαθούς μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας αποτελεί μια πρόκληση, διότι έχουν εμφανιστεί ποικίλα φαρμακευτικά πρωτόκολλα για την αντιμετώπισή της χωρίς κανένα από αυτά να επιτυγχάνει ύφεση σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 80-90% των ασθενών. Άλλωστε δεν θα πρέπει να λησμονηθεί ότι στο ένα τρίτο των ασθενών παρατηρείται αυτόματη ύφεση της νόσου σε διάστημα 6 μηνών με ένα χρόνο χωρίς καμία παρέμβαση. Ερευνητικά πολλές μελέτες διεξήχθησαν αρχικά σε πειραματόζωα και στη συνέχεια σε σειρές ασθενών.

#### **3.2.1 Θεραπείες σε ζώα**

Οι Gwinner και συν (1999) μελέτησαν την επίδραση της παραγωγής ελευθέρων ριζών, όπως υπεροξειδίου του οξυγόνου, σε μοντέλο μεμβρανώδους PHN. Παρατήρησαν ότι η δημιουργία των ανοσοσυμπλεγμάτων μεγκαλίνης-antiFx1 υποεπιθηλιακά μετατρέπει την διυδρογενάση της ξανθίνης στην οξειδωμένη της μορφή. Υπεύθυνο γι αυτή της οξειδωτική διαδικασία θεωρείται ένα ένζυμο, η οξειδάση της ξανθίνης, της οποίας η δραστηριότητα αυξάνει 2-5 φορές κατά την ανάπτυξη του μοντέλου του Heymann. Η χορήγηση ενός αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης (βολφράμιο) πριν την επαγωγή της νεφρίτιδας του Heymann ελάττωσε την πρωτεϊνουρία κατά 80%. Ο ανοσοφθορισμός για C3 και C4b-9 δεν έδειξε όμως

διαφορά ανάμεσα στις τρεις ομάδες μελέτης (υγείς αρουραίοι, πάσχοντες από ιδιοπαθή μεμβρανώδη και πάσχοντες που έλαβαν βολφράμιο)<sup>48</sup>.

Η τριπτολίδη ένα φάρμακο με ανοσοκατασταλτική, αντιφλεγμονώδη και αντιπρωτεϊνουρική δράση έχει χορηγηθεί σε μοντέλο νεφρίτιδας του Heymann. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση της πρωτεϊνουρίας, του ποσού των κυκλοφορούντων IgG αντισωμάτων των αρουραίων, με συνοδό μείωση των C5b-9. Η έκφραση της δεσμίνης που αποτελεί δείκτη ποδοκυτταροπάθειας εξαλείφθηκε μετά τη θεραπεία με τριπτολίδη, ταυτόχρονα με την αποκατάσταση της αρχιτεκτονικής των ποδικών εκβλαστήσεων. Η ευεργετική δράση της τριπτολίδης αποδόθηκε στην απενεργοποίηση της οξειδάσης NADPH, η οποία καταστέλλει την παραγωγή ελεύθερων ριζών, καθώς και την p38 μιτογονική κινάση που αποκαθιστά τη δραστηριότητα της RhoA. Συμπερασματικά, λοιπόν, μπορεί να θεωρηθεί ότι η τριπτολίδη μειώνει την πρωτεϊνουρία ασκώντας προφυλακτική δράση στα ποδοκύτταρα σε μοντέλο νεφρίτιδας του Heymann<sup>49</sup>.

Οι Zoja και συν (2005) μελέτησαν τον συνδυασμό αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτενσίνης (ACE) με HMG CoA αναγωγάση (στατίνες) σε αρουραίους με προχωρημένη νεφρική νόσο και πρωτεϊνουρία. Το μοντέλο αυτό της νεφρίτιδας του Heymann επιτεύχθηκε με ετερόπλευρη νεφρεκτομή στους αρουραίους 7 μέρες μετά την χορήγηση του antiFx1 και αναμονή 4 μηνών ώστε τα πειραματόζωα να εγκαταστήσουν σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια και μεγάλη πρωτεϊνουρία. Στη συνέχεια χωρίστηκαν σε πέντε ομάδες στα οποία χορηγούνταν καθημερινά: στην πρώτη ομάδα κανένα φάρμακο, στη δεύτερη ομάδα λισινοπρίλη 40 mg/L, στην τρίτη ομάδα λισινοπρίλη 400 mg/L, στην τέταρτη ομάδα συμβαστατίνη 2 mg/kg και στην πέμπτη ομάδα λισινοπρίλη 40 mg/L και συμβαστατίνη. Επίσης, έξι υγιή ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν για να αποτελέσουν την ομάδα ελέγχου<sup>50</sup>.

Στο τέλος της θεραπείας μετά από 10 μήνες μελετήθηκε το ποσοστό μείωσης της πρωτεϊνουρίας, η αρτηριακή πίεση, η χοληστερόλη, οι δείκτες διάμεσης φλεγμονής, όπως τα CD4, τα CD8, ο ED-1 (παρουσία μακροφάγων), ο OX-6 (MHC-2) και η παρουσία MCP-1 mRNA. Με τη συνδυασμένη θεραπεία, η αρτηριακή πίεση του αίματος και η χοληστερίνη επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα, ενώ η πρωτεϊνουρία μειώθηκε περισσότερο σχέση με την μονοθεραπεία με συμβαστατίνη. Παραδόξως η μονοθεραπεία με λισινοπρίλη δεν βελτίωσε την πρωτεϊνουρία πιθανά



λόγω της βαρύτητας της ήδη εγκατεστημένης βλάβης. Παρομοίως η διάμεση ίνωση και η διαμεσοσωληναριακή φλεγμονή στον εναπομείναντα νεφρού βελτιώθηκε μερικώς με τη συμβαστατίνη και υποστράφηκε σχεδόν τελείως με το συνδυασμό αναστολέα του MEA και HMG CoA αναγωγή. Η βελτίωση των ιστολογικών βλαβών και της πρωτεϊνουρίας από το συνδυασμό του αναστολέα του MEA με την HMG CoA αναγωγή αποδίδεται στη μείωση της ενδοσπειραματικής πίεσης διήθησης, της πάχυνση της βασικής μεμβράνης και τη διατήρηση του αρνητικού φορτίου της βασικής μεμβράνης των τριχοειδών του σπειράματος<sup>50</sup>.

Μια ενδιαφέρουσα μελέτη της δράσης της τακρολίμης ενός αναστολέα της καλσινευρίνης το 2014 έρχεται να δώσει ένα νέο μηχανισμό δράσης του παράγοντα αυτού στα ποδοκύτταρα. Οι Lei Peng και συν χορήγησαν σε αρουραίους από το στόμα τακρολίμη και μελέτησαν την επίδραση που είχε στα επίπεδα του Αγγειοποιητικού παράγοντα 4 (Angptl4) σε ιστολογικό υλικό από τα νεφρά των αρουραίων και στα ούρα. Ο Angptl4 εκτός από το νεφρό παράγεται κυρίως από το ήπαρ και τον λιπώδη ιστό και λιγότερο από τους μυς και την καρδιά. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η παραγωγή του Angptl4 από το ποδοκύτταρα αυξάνεται σε ποδοκυτταροπάθειες όπως η μεμβρανώδης και η νόσος των ελαχίστων αλλοιώσεων σε αντίθεση με μη ποδοκυτταροπαθητικές σπειραματονεφρίτιδες όπως η μεσαγγειοϋπερπλαστική.

Η τακρολίμη χορηγήθηκε την 7<sup>η</sup> ημέρα μετά τη χορήγηση του antiFx1 και εξετάστηκαν τα επίπεδα Angptl4, η πρωτεϊνουρία και η ιστολογική εικόνα στις 14,21 και 28 μέρες. Η πρωτεϊνουρία υφέθηκε, με παράλληλη μείωση των επιπέδων του Angptl4 σε σχέση με τα μη θεραπευμένα πειραματόζωα και αποκατάσταση της αρχιτεκτονικής δομής των ποδοκυττάρων. Στον ανοσοφθορισμό παρατηρήθηκε μείωση των IgG, C5b-9 καθώς και της δεσμίνης η οποία είναι δείκτης ποδοκυτταρικής βλάβης. Από τα προαναφερθέντα ευρήματα συμπεραίνεται ότι η τακρολίμη μειώνει την πρωτεϊνουρία και μέσω της μειωμένης παραγωγής του Angptl4<sup>44</sup> εκτός από τις γνωστούς μηχανισμούς δράσης της, όπως σταθεροποίηση του κυτταροσκελετού και ανοσοκαταστολή.

### 3.2.2 Θεραπείες στον άνθρωπο

Κατά τη διάρκεια των δεκαετιών μελέτης της Ιδιοπαθούς Μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας το βασικό ερώτημα το οποίο παραμένει, είναι εάν η μείωση της πρωτεϊνουρίας οφείλεται στη θεραπεία ή είναι αποτέλεσμα αυτόματης υποστροφής. Το 2010 δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα μιας πολυκεντρικής ισπανικής μελέτης στην οποία οι ασθενείς αντιμετωπίστηκαν συντηρητικά με αναστολείς του άξονα ρενίνης-αγγειοτενσίνης αλδοστερόνης, μέχρι να εμφανίσουν τις επιπλοκές του νεφρωσικού συνδρόμου ή να παρουσιάσουν έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Οι ασθενείς ήταν υπό παρακολούθηση για τουλάχιστον για 6 χρόνια, ενώ για αυτούς που εισήλθαν σε αυτόματη ύφεση έφτασε στα 14 χρόνια. Σε μερική ή ολική ύφεση εισήλθε το 32% (104/328) το οποίο είχε αρχική πρωτεϊνουρία κατά μέσο όρο 6,6gr/24ωρο και τελική 1,8gr/24ωρο σε ένα χρονικό διάστημα  $14,7 \pm 11$  μηνών. Συχνότερα εισερχόταν σε ύφεση γυναίκες κάτω των 50 ετών οι οποίες είχαν πρωτεϊνουρία <8 gr/24ωρο. Από τους ασθενείς με πρωτεϊνουρία μεγαλύτερη των 8gr σε αυτόματη ύφεση εισήλθε το 25%. Όσοι ασθενείς δεν παρουσίασαν ύφεση της πρωτεϊνουρίας αντιμετωπίστηκαν με τα άλλα καθιερωμένα πρωτόκολλα θεραπείας. Επίσης ενδιαφέρον είχαν τα αποτελέσματα από τα καταληκτικά σημεία ένταξης σε αιμοκάθαρση και θανάτου. Οι ασθενείς που παρουσίασαν αυτόματη σε ύφεση είχαν 0% πιθανότητα ένταξης σε κάθαρση και θνητότητα 2% έναντι 19% και 11% αντίστοιχα αυτών που δεν παρουσίασαν αυτόματη ύφεση<sup>190</sup>.

Το πιο δημοφιλές πρωτόκολλο θεραπείας είναι αυτό που προτάθηκε από τον Ponticelli και συν, έχει διάρκεια 6 μήνες και περιλαμβάνει για τους μήνες 1,3,5, τις 3 πρώτες μέρες ενδοφλέβιες ώσεις στεροειδών με συνέχιση τους από το στόμα για τις μέρες 4-30 και για τους μήνες 2,4,6 χορήγηση από το στόμα είτε χλωραμβουκίλης είτε κυκλοφωσφαμίδης (τροποποιημένο Ponticelli). Το πλεονέκτημα αυτού του πρωτοκόλλου έναντι του Ολλανδικού, το οποίο περιλαμβάνει καθημερινή συγχορήγηση από το στόμα κυκλοφωσφαμίδης και στεροειδών, είναι ότι οι ασθενείς λαμβάνουν μόνο το 1/3 της δόσης της κυκλοφωσφαμίδης και για αυτό παρουσιάζουν μικρότερη πιθανότητα για ανάπτυξη νεοπλασιών του δέρματος, της ουροδόχου κύστεως και λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων. Φυσικά δεν θα πρέπει να παραγνωρίζονται και οι άμεσες παρενέργειες της θεραπείας με κυκλοφωσφαμίδη που είναι η ευπάθεια σε ευκαιριακές λοιμώξεις λόγω ανοσοκαταστολής, η αιμορραγική κυστίτιδα και οι γαστρεντερικές διαταραχές. Απώλεια τριχών συνήθως δεν

παρουσιάζεται με αυτή τη δοσολογία. Η χλωραμβουκίλη έχει περάσει στο παρασκήνιο λόγω αυξημένων παρενεργειών<sup>45</sup>.

Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας περίπου το 81% των ασθενών στις μελέτες Ponticelli του 1989 και 1995 και του Jha το 2007 έδειξαν μερική ή πλήρη ύφεση της πρωτεϊνουρίας, διατήρηση της νεφρικής λειτουργίας, σταθεροποίηση της αρτηριακής πίεσης, ύφεση των οιδημάτων, ρύθμιση της δυσλιπιδαιμίας και αύξηση της λευκοματίνης ορού. Τα ποσοστά υποτροπών ήταν περίπου 23-25% με καλή ανταπόκριση στην επαναχορήγηση της ίδιας αγωγής ή αλλαγή της σε αναστολέα της καλσινευρίνης. Παραμένει το πρόβλημα των ευκαιριακών λοιμώξεων και η σποραδική ανάπτυξη νεοπλασιών. Η 10 ετής νεφρική επιβίωση αγγίζει το 90%<sup>54</sup>.

Το ερώτημα της έγκαιρης έναρξης της ανοσοκαταστολής προσπάθησαν να απαντήσουν οι Buif-Vereijken και συν και ο Hofstra και συν από Ολλανδία. Οι Buif-Vereijken και συν εφάρμοσαν το πρωτόκολλο της ετήσιας χορήγησης θεραπείας σε ασθενείς που είχαν αρχίσει να επηρεάζουν την νεφρική τους λειτουργία (μέσος ρυθμός σπειραματικής διήθησης  $42\text{ml/min}$  ανά  $1,73\text{m}^2$ ) και είχαν σοβαρή πρωτεϊνουρία. Στην 5ετία η νεφρική επιβίωση ήταν 86% στην ομάδα που έλαβε αγωγή έναντι 32% της ομάδας που δεν έλαβε, ενώ στην 7ετία η νεφρική επιβίωση περιορίστηκε στο 74%. Βέβαια στη μελέτη των Ponticelli και συν, όπως προαναφέρθηκε, τα αποτελέσματα ήταν σαφώς καλύτερα με τη 10 ετή νεφρική επιβίωση να ανέρχεται στο 90%. Ο Hofstra και συν συνέκριναν άμεσα ασθενείς, οι οποίοι έλαβαν αγωγή με τη διάγνωση της νόσου σύμφωνα με το ολλανδικό πρωτόκολλο, με ασθενείς που τους χορηγήθηκε θεραπεία όταν η κρεατινίνη αυξήθηκε κατά από 50% πάνω από τιμή που είχαν κατά τη διάγνωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν και στις δύο ομάδες ανταπόκριση 92% περίπου, αλλά αυτοί που άρχισαν θεραπεία πιο έγκαιρα εισήλθαν ταχύτερα σε ύφεση. Η εν συνεχεία παρακολούθηση τους έδειξε ίδιο ποσοστό υποτροπών (περίπου 23%)<sup>46,47</sup>.

Οι αναστολείς της καλσινευρίνης (κυκλοσπορίνη και τακρολίμη) μαζί με μικρή δόση στεροειδών μπορούν να επιτύχουν ύφεση της πρωτεϊνουρίας σε ποσοστό 80% των ασθενών. Χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις, όπου υπάρχει ανθεκτικότητα στο σχήμα Ponticelli και επιτυγχάνουν μερική ύφεση κατά μέσο όρο στους 9.7 μήνες και πλήρη στους 15 μήνες. Η 6μηνη ύφεση δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή και συνήθως δεν

ξεπερνά το 10%, ενώ πρόβλημα παραμένει το υψηλό ποσοστό υποτροπών μετά τη διακοπή της χορήγησης τους το οποίο ανάλογα με τη μελέτη αρχίζει από 13% και φτάνει το 50%. Λύση σε αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να είναι η διατήρηση μιας μικρής δόσης του φαρμάκου με ή χωρίς παράλληλη χορήγηση στεροειδών για μεγαλύτερο διάστημα από τη συνήθη 2ετή αγωγή<sup>50</sup>. Γενικά η δράση των αναστολέων καλσινευρίνης αρχίζει στο 3μήνο με τη μέγιστη αντιπρωτεϊνουρική δράση να παρατηρείται στους 12-18 μήνες θεραπείας. Συνήθως χορηγείται μια σταθερή δόση για 6-12 μήνες, η οποία προσαρμόζεται ανάλογα τα επίπεδα τους στο αίμα και στη συνέχεια γίνεται σταδιακή διακοπή στους 18-24 μήνες. Μελέτες παρακολούθησης της μακροχρόνιας χορήγησης αναστολέων καλσινευρίνης στην ιδιοπαθή μεμβρανώδη δεν υπάρχουν και γενικά η πρακτική που ακολουθείται είναι η στενή παρακολούθηση των επιπέδων του φαρμάκου στο αίμα και της νεφρικής λειτουργίας, ιδιαίτερα σε ασθενείς που παρουσιάζουν σωληναριοδιάμεση βλάβη στη βιοψία νεφρού και υψηλή τιμή κρεατινίνης κατά την έναρξη της αγωγής<sup>45</sup>.

Στα πλαίσια εκτίμησης της ανταπόκρισης του συνδυασμού κυκλοσπορίνης-στεροειδών, έναντι του σχήματος Ponticelli δυο μελέτες έχουν ολοκληρωθεί με αξιόπιστα αποτελέσματα. Η πρώτη δημοσιεύτηκε από τον Γούμενο το 2007. Είναι αναδρομική μελέτη παρακολούθησης 10ετίας δύο ομάδων ασθενών όπου η 1η (31 ασθενείς) έλαβε Ponticelli και η 2<sup>η</sup> (46 ασθενείς) έλαβε κυκλοσπορίνη για 2 χρόνια με στεροειδή. Η ομάδα της κυκλοσπορίνης είχε μεγαλύτερο ποσοστό ύφεσης της νόσου (85% έναντι 55%) αλλά και μεγαλύτερο ποσοστό υποτροπών μετά την διακοπή της θεραπείας (41% έναντι 29%). Σε διάρκεια παρακολούθησης 48±36μηνών μετά τη διακοπή της θεραπείας δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στο ποσοστό που παρουσίασε εξέλιξη της νεφρικής ανεπάρκειας ή εντάχθηκε σε εξωνεφρική κάθαρση. Η δεύτερη μελέτη δημοσιεύτηκε το 2010 περιελάμβανε 73 ασθενείς και διεξήχθη στην Κίνα. Η μια ομάδα έλαβε Τακρολίμη για 9 μήνες και η άλλη κυκλοσπορίνη από το στόμα καθημερινά για 4 μήνες. Και οι δυο ομάδες ελάμβαναν παράλληλα στεροειδή. Τα ποσοστά ύφεσης της νόσου στο έτος ήταν εφάμιλλα, ενώ η ομάδα του τακρολίμης είχε λίγο περισσότερες υποτροπές (18% έναντι 23%). Λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών, της μικρής χρονικά παρακολούθησης δεν κατέστη εφικτό να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα και αναμένονται τα αποτελέσματα από μελέτες που είναι σε εξέλιξη στο Ηνωμένο Βασίλειο<sup>45</sup>.

Το rituximab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του αντιγόνου επιφανείας CD20 των Β λεμφοκυττάρων. Η δράση του στην ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια μελετήθηκε για πρώτη φορά από τους Remuzzi και συν το 2002. Η ιδέα της εκλεκτικής αναστολής των κυττάρων που παράγουν τα υπεύθυνα αυτοαντισώματα, προέρχεται από τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της νόσου. Η εκλεκτική αναστολή συγκεκριμένου παθοφυσιολογικού μονοπατιού αποτρέπει τη μη εκλεκτική ανοσοκαταστολή. Χορηγήθηκαν τον πρώτο μήνα τέσσερις εβδομαδιαίες εγχύσεις rituximab των 375 mg/m<sup>2</sup> σε οκτώ ασθενείς με ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια και νεφρωσικού επιπέδου πρωτεϊνουρία (>3.5 gr/24ωρο) και στη συνέχεια παρέμειναν υπό παρακολούθηση για ένα έτος. Στους τρεις και έξι μήνες, η πρωτεϊνουρία ελαττώθηκε σημαντικά ενώ η λευκωματίνη του πλάσματος αυξήθηκε. Στους 12 μήνες, η πρωτεϊνουρία μειώθηκε στο ≤0,5 gr/24ωρο. Παράλληλα με τη βελτίωση του οιδήματος, μειώθηκε το βάρος του σώματος, η διαστολική πίεση και η χοληστερόλη στον ορό του αίματος. Κανένας ασθενείς δεν παρουσίασε σοβαρές επιπλοκές<sup>51</sup>.

Ακολούθησαν και άλλες μελέτες με αντίστοιχα αποτελέσματα και ποικίλα δοσολογικά σχήματα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του αριθμού των ασθενών παρουσιάζει η μελέτη του Ruggenenti και συν το 2012 όπου το rituximab χορηγήθηκε ως μονοθεραπεία σε 100 ασθενείς, εκ των οποίων οι 32 είχαν προηγουμένως λάβει άλλα καθιερωμένα θεραπευτικά σχήματα χωρίς ανταπόκριση. Μετά από 29 μήνες παρακολούθηση 65 ασθενείς είχαν μερική ή πλήρη ύφεση, ενώ από τους υπόλοιπους 35 οι 20 είχαν μείωση πρωτεϊνουρίας >50%. Στο διάστημα αυτό παρατηρήθηκαν 18 υποτροπές που αντιμετωπίστηκαν με νέο κύκλο θεραπείας. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι πέρα από ήπιες αντιδράσεις όπως ερυθρότητα δέρματος, κνησμό, ένα υποτασικό επεισόδιο και ένα επεισόδιο βρογχόσπασμου που αντιμετωπίστηκε συντηρητικά με βρογχοδιασταλτικά, δεν παρατηρήθηκε καμία σοβαρή λοίμωξη ή νεοπλασία σχετιζόμενη με το φάρμακο. Όλα τα επεισόδια αλλεργικών αντιδράσεων αντιμετωπίστηκαν συντηρητικά με χορήγηση αντιϊσταμινικών, στεροειδών και ορού. Όσον αφορά τα καταληκτικά σημεία 4 ασθενείς οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία εντάχθηκαν σε αιμοκάθαρση και 4 απεβίωσαν από καρδιολογικά αίτια<sup>45,52,53</sup>.

Οι Beck και συν μελέτησαν την επίδραση του rituximab στα επίπεδα των anti-PLA2R αντισωμάτων και παρατήρησαν ότι η εξάλειψη των CD20 ακολουθήθηκε από την

εξάλειψη των anti-PLA2R αντισωμάτων από τον ορό και σταδιακή υποστροφή της πρωτεϊνουρίας. Η επίδραση του rituximab υφίσταται για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την χορήγηση του φαρμάκου μολονότι ο αριθμός των CD20 μπορεί να αυξηθεί. Η παρατήρηση αυτή γέννησε το ερώτημα αν θα μπορούσαν να μειωθούν οι δόσεις του φαρμάκου. Το 2007 οι Cranendi και συν. χορήγησαν μια δόση των 375 mg/m<sup>2</sup> και στη συνέχεια παρακολούθησαν τον αριθμό των CD20 και την πρωτεϊνουρία. Κλινική υποτροπή της νόσου παρατηρήθηκε όταν ο αριθμός των B λεμφοκυττάρων ξεπέρασε τα 5/mm<sup>3</sup> οπότε χορηγήθηκε μια επιπλέον δόση με εξίσου καλά αποτελέσματα. Αδημοσίευτα δεδομένα του Ruggenenti και συν που ανήκει στην ίδια ομάδα αναφέρουν ότι στην κλινική πράξη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τα επίπεδα του anti-PLA2R αντισωμάτων ως δείκτης ενεργότητας της νόσου <sup>45,52,53</sup>.

Το μυκοφαινολικό μοφετίλ του οποίου άλλη μορφή είναι το μυκοφαινολικό οξύ, είναι αντιμεταβολίτης ο οποίος αναστέλλει την ινοσίνη της μονοφωσφορικής διυδρογενάσης των λεμφοκυττάρων. Το 2007-2008 έγιναν 3 μελέτες με κυριότερη αυτή του Branten και συν από την Ολλανδία, οι οποίοι χορήγησαν 2gr μυκοφαινολικού μαζί με στεροειδή σε 32 ασθενείς, με ομάδα σύγκρισης ίσο αριθμό ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε τροποποιημένο σχήμα Ponticelli. Η αποτελεσματικότητα του μυκοφαινολικού ήταν εφάμιλλη όσον αφορούσε την ύφεση του νεφρωσικού στο ένα έτος, ωστόσο το 57% των ασθενών παρουσίασε υποτροπή ακόμη και κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Αντίστοιχα υψηλό ποσοστό υποτροπών 33% έδειξε και μια άλλη μελέτη με έναν άλλο αντιμεταβολίτη την αζαθειοπρίμη το 2011 από την ομάδα των Naumovic και συν, όπου χορηγήσαν αζαθειοπρίμη και τη συνέκριναν με τη κυκλοσπορίνη. Το μυκοφαινολικό θεωρείται ότι το μπορεί να χορηγηθεί μόνο ως θεραπεία δεύτερης γραμμής σε ασθενείς με επηρεασμένη νεφρική λειτουργία οι οποίοι δεν παρουσιάζουν καλή ανοχή στις θεραπείες πρώτης γραμμής <sup>45</sup>.

Η ACTH (αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη) είναι ένας ‘φίλος από τα παλιά’ καθώς είχε χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική της δράση σε ποικίλης αιτιολογίας νεφρωσικά σύνδρομα αλλά και σε άλλα ανοσολογικά νοσήματα (Ψωρίαση, Ρευματοειδή αρθρίτιδα, Σκληρόδερμα, Ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, Συστηματικός ερυθματώδης λύκος, Σκλήρυνση κατά πλάκας) αλλά εγκαταλείφτηκε σταδιακά μετά την εισαγωγή των από του στόματος στεροειδών. Η διεθνής βιβλιογραφία έχει να παρουσιάσει δύο μελέτες. Η μια, αφορά

μια συνθετική παλαιότερη μορφή της ACTH 1-24 η οποία στερείται το c-τελικό άκρο και μια νεότερη σε μορφή γέλης (gel) με c-τελικό άκρο και ινσουλινοτρόπο δράση. Για την παλαιότερη μορφή η μελέτη που παρουσιάστηκε ήταν το 1999 από τον Berg και συν και περιελάμβανε 14 ασθενείς με ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια, οι οποίοι προηγουμένως είχαν λάβει άλλη αγωγή χωρίς ανταπόκριση. Πέντε από αυτούς τους ασθενείς έλαβαν ACTH 1-24 1mg/δυο φορές την εβδομάδα για ένα χρόνο και οι υπόλοιποι μόνο για 2 μήνες. Όλοι οι ασθενείς για διάστημα παρακολούθησης ενός έτους παρέμεναν σε πλήρη ύφεση. Αυτοί που έλαβαν αγωγή για ένα χρόνο παρέμειναν σε ύφεση και 18 μήνες μετά <sup>45</sup>.

Ο Ponticelli και συν (2006) βασιζόμενοι σε αυτά τα θεαματικά αποτελέσματα θέλησαν να συγκρίνουν το δικό τους του θεραπευτικό σχήμα με την ACTH. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δυο ομάδες, η πρώτη ομάδα έλαβε το κλασσικό σχήμα των 6 μηνών και η δεύτερη ομάδα έλαβε συνθετική ACTH ενδομυϊκά δυο φορές την εβδομάδα για ένα χρόνο. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι και οι δυο ομάδες ασθενών είχαν την ίδια ανταπόκριση (93% έναντι 87%) και τον ίδια συχνότητα υποτροπών ένα χρόνο και δυο χρόνια μετά την έναρξη της θεραπείας τους. Βέβαια αξίζει να επισημανθεί ότι οι ασθενείς δεν είχαν σοβαρή νόσο (κρεατινίνη μικρότερη του 1,5mg/dl) και η πρωτεϊνουρία στην πλειοψηφία των ασθενών δεν υπερέβαινε τα 6-7gr/24ωρο <sup>45</sup>. Δύο ασθενείς οι οποίοι είχαν σοβαρή πρωτεϊνουρία (10-13gr/24ωρο) είχαν λάβει προ 6μήνου σχήμα Ponticelli. Αντίστοιχη ανταπόκριση παρατηρήθηκε και στην μελέτη των Bombark και συν το 2011 στην οποία χορηγήθηκαν ενδομυϊκά 40-80 μονάδες γέλης ACTH 1-39 σε 11 ασθενείς με ιδιοπαθή μεμβρανώδη ανταπόκριση 2 φορές την εβδομάδα. Η πρωτεϊνουρία κατά την διάγνωση στους 9 ασθενείς ήταν ήπια προς μέτρια (2,6-4,8gr/24ωρο) <sup>45</sup>.

Ο μηχανισμός δράσης του φαρμάκου φαίνεται να μην είναι μόνο η ανοσοκατασταλτική και αντιφλεγμονώδης δράση του, αλλά και η άμεση επίδραση πάνω στον μελανοκορτικοτρόπο υποδοχέα των ποδοκυττάρων μέσω της οποίας αποκαθίσταται η έκφραση των ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών και η αρχιτεκτονική των ποδικών προσεκβολών. Η επιβεβαίωση της μακροχρόνιας αποτελεσματικότητας αυτής της θεραπείας απαιτεί περισσότερες μελέτες μακροχρόνιας παρακολούθησης <sup>45,54</sup>.

## **4. mTOR, RAPTOR και διάλυτος akt**

### **4.1 Η mTOR κινάση**

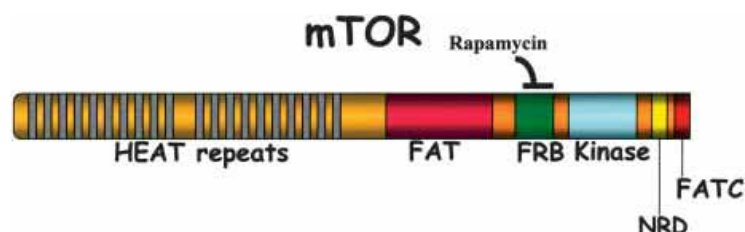
Η TOR (Στόχος της ραπαμυκίνης) είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία εμπλέκεται στην κυτταρική αύξηση των μυκήτων και στον πολλαπλασιασμό των φυτών και των θηλαστικών. Εντοπίστηκε ως πρωτεΐνη, όταν πραγματοποιήθηκε η προσπάθεια ανεύρεσης της πρωτεΐνης-στόχου του αντιβιοτικού και ανοσοκατασταλτικού φαρμάκου ραπαμυκίνη, η οποία ανιχνεύτηκε στα δείγματα εδάφους που συνέλλεξαν Ολλανδοί ερευνητές από το νησί του Πάσχα (Napa Nui). Η ραπαμυκίνη απομονώθηκε από τον οργανισμό *streptomyces hygrosopicus*. Αρχικά διαπιστώθηκε ότι η ραπαμυκίνη είχε σημαντικές αντιμυκητησιακές ιδιότητες, στη συνέχεια όμως παρατηρήθηκε, ότι αναστέλλει και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Εκτός από τις αντιμυκητησιακές της ιδιότητες έχει αντικαρκινικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Στη φαρμακοβιομηχανία έγινε γνωστή με τα εμπορικά ονόματα Sirolimus και Rapamune<sup>59</sup>.

Το γονιδίωμα των μυκήτων κωδικοποιεί δυο πρωτεΐνες: την TOR1 και TOR2. Στα θηλαστικά, το γονιδίωμα κωδικοποιεί μόνο μια πρωτεΐνη την mTOR (mammalian TOR) με 42% ομολογία αμινοξέων με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες TOR1 και TOR2 των μυκήτων. Οι TORs είναι πρωτεΐνες μεγάλου ΜΒ (289kDa, 2549 αμινοξέα) που περιλαμβάνουν πολλαπλά, διακριτά, δομικά και διατηρημένα εξελικτικά τμήματα<sup>60</sup>. Η mTOR κλωνοποιήθηκε και προσδιορίστηκε ανεξάρτητα μετά την ανακάλυψη των γονιδίων TOR1 και TOR2. Ονομάστηκε, αρχικά, FRAP (FKBP–rapamycin-associated protein), RAFT1 (rapamycin and FKBP target), ή RAPT1 (rapamycin target) ενώ σήμερα έχει επικρατήσει ο όρος mTOR<sup>60</sup>.

Η ραπαμυκίνη συνδέεται με την FK506-δεσμευτική πρωτεΐνη (FKBP12), δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα, το οποίο με τη σειρά του ενώνεται με το καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών TOR (FRB τμήμα). Αυτή η ένωση έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της λειτουργίας των TOR πρωτεϊνών. Η TOR διαθέτει ένα αμινοτελικό άκρο, το οποίο αποτελείται από 20 επαναλαμβανόμενα τμήματα HEAT (Huntignton, EF3, A subunit of PP2A, TOR1), που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (εικόνα 12) και ένα καρβοξυτελικό άκρο, το



οποίο έχει δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης και είναι παρόμοιο με το καταλυτικό τμήμα της κινάσης των φωσφοϊνοσιτιδίων P13K. Ωστόσο, δεν παρουσιάζει δραστηριότητα λιπιδικής κινάσης. Πριν από το καταλυτικό τμήμα, υπάρχει η θέση FRB και ένα μεγάλο τμήμα FAT(από FRAP, ATM, TRAP) που είναι κοινό για όλες τις κινάσες της οικογένειας P13K. Το FAT περιέχει και το τμήμα FATC που είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της κινάσης, καθώς η απαλοιφή οποιουδήποτε αμινοξέος του καταργεί τη δραστηριότητά της. Τα τμήματα FAT και FATC βοηθούν στην έκθεση του καταλυτικού άκρου της πρωτεΐνης, μεταβάλλοντας τη διαμόρφωσή της, ενώ υπάρχει και ένα άλλο τμήμα το NRD το οποίο πιθανώς να έχει αρνητική ρυθμιστική δράση<sup>61</sup>.



**Εικόνα 12:** Η δομή της mTOR. Από: Hay N et al 2004

Η ρύθμιση της mTOR πραγματοποιείται με τη βοήθεια δυο άλλων πρωτεϊνών: της πρωτεΐνης σύνδεσης του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτικών κυττάρων(eukaryotic initiation factor 4E-binding protein (4E-BP1)) και τον φωσφορυλιωτή-ενεργοποίησης της κινάσης S6 (S6K). Η mTOR έχει ενδογενή δραστηριότητα Ser/Thr κινάσης που οδηγεί σε αυτοφωσφορυλίωση στη θέση Ser2481<sup>61</sup>. Υπάρχουν υπόνοιες, ότι η αυτοφωσφορυλίωση της mTOR είναι ικανή από μόνη της να προκαλέσει την ενεργοποίησή της και να φωσφορυλιώσει τις πρωτεΐνες 4E-BP1 και S6K. Επίσης, η mTOR μπορεί να λειτουργήσει ως σκελετός σύνδεσης για πρωτεΐνες-καταλύτες, όπως κινάσες και φωσφατάσες, οι οποίες ρυθμίζουν *in vivo* τη δραστηριότητά της<sup>62</sup>.

## 4.2 Τα συμπλέγματα TORC1 και TORC2

Η mTOR βρίσκεται σε δυο πρωτεϊνικά συμπλέγματα: το mTORC1, το οποίο αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη και το mTORC2, το οποίο θεωρείται λιγότερο ευαίσθητο και δεν αναστέλλεται από αυτήν άμεσα. Όμως και το mTORC2 μπορεί να

ανασταλεί μετά από παρατεταμένη θεραπεία με ραπαμυκίνη. Πιο συγκεκριμένα, η mTOR δεσμεύεται από το σύμπλοκο FKBP12-ραπαμυκίνης και δε δύναται να σχηματίσει άλλα συμπλέγματα με τις πρωτεΐνες που συνιστούν το mTORC2. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το mTORC1 εμφανίζει αντοχή στην αναστολή από ραπαμυκίνη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ραπαμυκίνη ενώ αρχικά προκάλεσε μείωση της φωσφορυλίωσης της 4EBP1 στη συνέχεια και μετά από παρατεταμένη επίδραση οδήγησε σε υπερφωσφορυλίωση και ανάνηψη της cap-εξαρτώμενης πρωτεϊνοσύνθεσης. Η λειτουργία της S6K παραμένει πάντα σε καταστολή παρουσία της ραπαμυκίνης. Η γενική αρχή που ισχύει για τα mTORC1 και mTORC2 δεν ευσταθεί πλήρως<sup>61,63</sup>.

Το σύμπλεγμα mTORC1 αποτελείται από την mTOR, τη ρυθμιστική πρωτεΐνη της mTOR (Regulatory associated protein of mTOR, Raptor), την mSIN1 (mammalian stress activated protein kinase [SAPK]-interacting protein), την mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), την πρωτεΐνη υπόστρωμα της Akt πλούσια σε προλίνη [proline rich AKT substrate 40 kDa (PRAS40)] και τέλος την DEP-domain-containing mTOR-interacting protein (Deptor)<sup>64</sup>. Η πρωτεΐνη mLST8 δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του mTORC1 in vivo, αλλά μόνο τη λειτουργία του mTORC2. Η PRAS40 και η Deptor θεωρούνται αρνητικοί ρυθμιστές του mTORC1. Όταν ενεργοποιείται η δραστηριότητα του mTORC1, τότε οι πρωτεΐνες φωσφορυλιώνονται, ενώ όταν η δραστηριότητά του μειώνεται, τότε οι πρωτεΐνες συνδέονται στο σύμπλεγμα του mTORC1 και το αναστέλλουν πλήρως<sup>65</sup>.

Η Raptor είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 150 kDa, η οποία περιέχει τρεις επαναλήψεις HEAT και επτά επαναλήψεις WD-40 και βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της mTOR και εκτός από αυτή μπορεί να συνδεθεί με την S6K1 και την 4EBP1. Το καρβοξυτελικό τμήμα της mTOR όμως μπορεί να συνδεθεί με τη Raptor. Πολλές μεταλλάξεις της Raptor είτε στο αμινοτελικό άκρο της είτε στις επαναλήψεις HEAT διαταράσσουν τη σύνδεση της με την mTOR, με συνέπεια την αλληλεπίδραση με αυτήν με ποικίλους τρόπους. Η Raptor θεωρείται απαραίτητη για τη λειτουργία της mTOR καθώς και θετικός ρυθμιστής της. Σε μια δημοσίευση, όμως επισημαίνεται ότι στην περίπτωση στέρησης των θρεπτικών συστατικών, οι Raptor-mTOR, σταθεροποιούνται με τέτοιο τρόπο, ώστε να αναστέλλεται η δραστηριότητας της mTOR<sup>61</sup>. Επίσης, η Raptor συνδέεται με τις πρωτεΐνες S6K και 4EBP1 σε μια περιοχή 5 αμινοξέων που ονομάζεται TOS (TOR signaling). Με τη σύνδεση αυτή ή

η Raptor εξασφαλίζει την «επαφή» της mTOR με τα υποστρώματά της (S6K και 4EBP1) και την επακόλουθη φωσφορυλίωσή τους από την mTOR. Μεταλλάξεις στο τμήμα TOS μειώνουν σημαντικά την ικανότητα της mTOR να φωσφορυλιώνει τα υποστρώματά αυτά <sup>67</sup>.

Από την άλλη πλευρά, το σύμπλεγμα mTORC2 συνδέει την mTOR με την πρωτεΐνη Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), την παρατηρούμενη με τη Rictor πρωτεΐνη (protein observed with Rictor-1 (Protor-1)), την mSIN1, την Deptor και την mLST8 η οποία είναι απαραίτητο δομικό και λειτουργικό συστατικό του mTORC2. Οι Rictor και η mSIN1 σταθεροποιούν η μία την άλλη και δημιουργούν το υπόβαθρο για τη δημιουργία του mTORC2. Η απουσία τους έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή σχηματισμού του συμπλέγματος mTORC2 και την αδυναμία φωσφορυλίωσης της Akt στη θέση Ser473. Από τα ανωτέρω συμπεραίνεται ότι το mTORC2 σύμπλεγμα πιθανόν να έχει το ρόλο της PDK2 κινάσης, που φωσφορυλιώνει την Akt στη θέση Ser473 <sup>64</sup>.

### 4.3 Οι ρυθμιστές της mTOR

#### 4.3.1 Η ρύθμιση της mTOR από τα θρεπτικά συστατικά

Σε καλλιέργειες μυκήτων οι πρωτεΐνες TOR αναπτύσσονται σε θρεπτικά υποστρώματα πλούσια σε άζωτο ή γλουταμίνη και αδρανοποιούνται, όταν τα θρεπτικά συστατικά μειωθούν <sup>68</sup>. Η ρύθμιση της mTOR αποτελεί ένα παράδειγμα συντονισμού παράλληλων οδών σε φυσιολογικές καταστάσεις. Η πρώτη οδός αφορά την επάρκεια θρεπτικών ουσιών και η δεύτερη οδός την παρουσία αυξητικών παραγόντων-κυτταροκινών. Στη ρύθμιση της mTORC1 από τις θρεπτικές ουσίες σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η πρωτεΐνη mLST8/GβL. Η mLST8/GβL αλληλεπιδρά με το τμήμα της κινάσης της mTOR, ανεξάρτητα από τη Raptor και τροποποιεί τη σύνδεση της mTOR και της Raptor ανάλογα με τις συνθήκες θρέψης. Η παρουσία πολλών αμινοξέων και άλλων θρεπτικών συστατικών οδηγεί στη δημιουργία του συμπλόκου mLST8–mTOR–Raptor και αυξάνει την ικανότητά του να φωσφορυλιώνει τις υποκείμενες κινάσες που θέτουν σε λειτουργία τους μηχανισμούς πρωτεϊνοσύνθεσης <sup>69</sup>.

Αντίθετα, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών περιορίζει την ικανότητα της mTORC1 να φωσφορυλιώνει τις κινάσες S6K και 4EBP1 και να θέτει σε λειτουργία τους μηχανισμούς της πρωτεϊνοσύνθεσης. Σημαντική διαφορά υπάρχει ανάμεσα στην αναστολή του mTORC1 από τη στέρηση θρεπτικών συστατικών και την αναστολή από τη χορήγησης ραπαμυκίνης. Η στέρηση των θρεπτικών συστατικών δε διακόπτει τη σύνδεση της Raptor με την mTOR, ενώ η ραπαμυκίνη προκαλεί αποσύνδεση των δυο πρωτεϊνών <sup>70</sup>.

#### 4.3.2 Η ρύθμιση της mTOR από αυξητικούς παράγοντες

Η mTOR ανταποκρίνεται στους αυξητικούς παράγοντες μέσω της κινάσης των φωσφο-ινοσιτιδίων-3-OH (PI3K). Η σύνδεση των αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς τους, όπως είναι η ινσουλίνη ή των προσομοιαζόντων στην ινσουλίνη αυξητικών παραγόντων (insulin-like growth factors IGFs) ή άλλων αυξητικών παραγόντων φωσφορυλιώνει το υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης (insulin receptor substrate, IRS) και ακολούθως οδηγεί σε ενεργοποίηση της PI3K. Η 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PIP2) που εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη μετατρέπεται από την P13K σε 3,4,5 τριφωσφορική φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PIP3). Τη σύνθεση και άθροιση της PIP3 ανταγωνίζεται η φωσφατάση των λιπιδίων και ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PTEN (phosphate and tensin homolog on chromosome 10). Οι μεταλλάξεις της PTEN προκαλούν ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR <sup>71</sup>, καρκινογένεση και αυτοανοσία. Τα κύτταρα που παρουσιάζουν ταυτόχρονα απώλεια της PTEN και της TOR έχουν φαινότυπο ταυτόσημο με εκείνο που παρατηρείται επί απουσίας της TOR. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη κυρίαρχη δράση της TOR απέναντι στην PTEN <sup>72</sup>.

Η παραγωγή όμως της PIP3 προκαλεί μετανάστευση των κινασών PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1) και Akt1 στην κυτταρική μεμβράνη και παράλληλα, φωσφορυλίωση της Akt1 στη θέση Thr308 (καταλυτική περιοχή) από την PDK1. Η Akt1 είναι γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση B (PKB) και ανήκει στις πρωτεΐνες AGC (ακρώνυμο για cAMP dependent, cGMP dependent, and protein kinase C). Η Akt1, στα κύτταρα των θηλαστικών εκφράζεται με τρεις μορφές την Akt1, την Akt2 και την Akt3, οι οποίες κωδικοποιούνται από τρία διαφορετικά γονίδια. Η S6K και η SGK (serum and glucocorticoid protein kinase) είναι κινάσες

που ανήκουν στην ίδια οικογένεια. Τα πειραματικά δεδομένα τοποθετούν την Akt στο σηματοδοτικό μονοπάτι μετά από την P13K και πριν από την mTOR. Η υπερέκφραση μιας ενεργοποιημένης μορφής Akt σε κύτταρα HEK-293 προάγει τη φωσφορυλίωση της 4EBP1 ακόμα και επί απουσίας αυξητικών παραγόντων <sup>73</sup>.

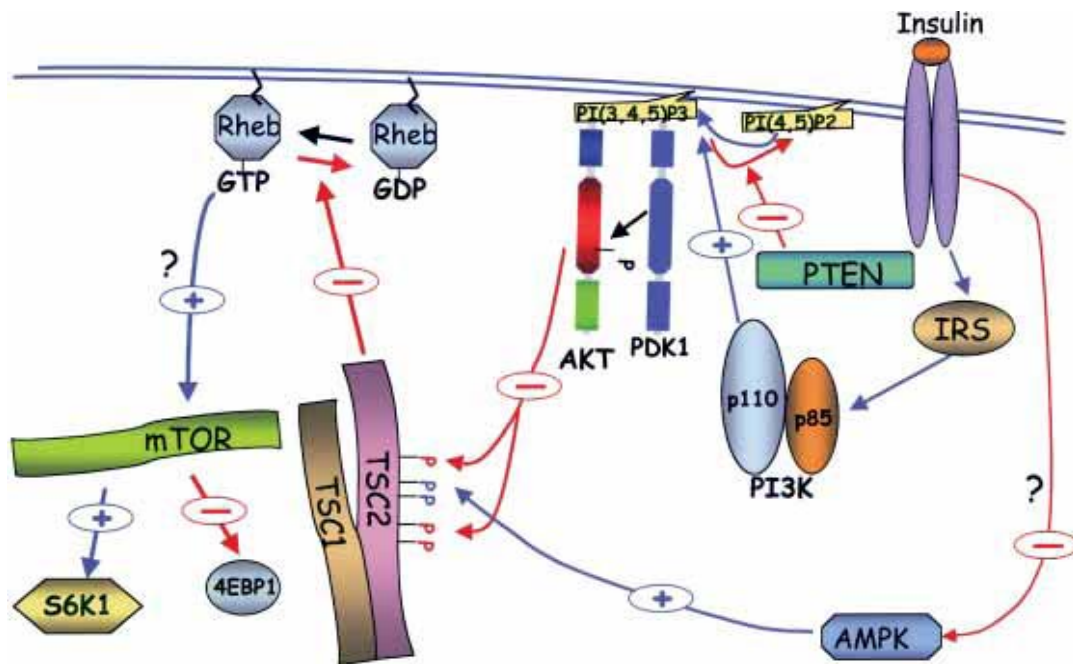
Η φωσφορυλίωση της Akt1 στη θέση Thr308 από την PDK1, έχει ως αποτέλεσμα τη μερική ενεργοποίηση της Akt1. Κατ'αναλογία η ενεργοποιημένη PDK1 προκαλεί άμεσα φωσφορυλίωση της S6K στην καταλυτική της περιοχή (Thr229) και μερική ενεργοποίηση αυτής. Η πλήρης ενεργοποίηση της Akt1 και της S6K απαιτεί μια δεύτερη φωσφορυλίωση στη θέση Ser473 για την Akt1 και Thr389 για την S6K που βρίσκονται στις ρυθμιστικές υδρόφοβες περιοχές (HM) τους, οι οποίες επιτελούνται από τη PDK2 κινάση <sup>74</sup>. Από τις κινάσες που έχουν περιγραφεί εκείνη η οποία φαίνεται να ανταποκρίνεται στο ρόλο της PDK2 είναι η mTOR, η οποία όταν συνδέεται στο Rictor προκαλεί φωσφορυλίωση του HM (Ser473) τόσο της Akt, όσο και της SGK, ενώ όταν συνδέεται με το Raptor παίζει το ρόλο της PDK2 (φωσφορυλίωση του HM) για την S6K <sup>75</sup>.

Ακόμα, υπάρχουν οι αναστολείς LY294002, PI-103 και NVP-BEZ235 που θεωρούνται ότι ειδικεύονται στην PI3K και φαίνονται να αναστέλλουν την mTOR. Δεν είναι γνωστό σε ποιο βαθμό η ικανότητα αυτών των μορίων να αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της Akt, αντιπροσωπεύει αναστολή μόνο της PI3K ή/και αναστολή και της mTOR και σε ποιά έκταση. Η χρήση νεότερων ειδικών αναστολέων της mTOR όπως η πυραζολοπυριμιδίνες PP242 και PP30 κατέδειξε ότι η Ser473 φωσφορυλίωση της Akt ασκείται ειδικά από την mTOR (συνδεδεμένη στο mTORC2) και είναι ανεξάρτητη από την Thr308 φωσφορυλίωση της Akt που ασκείται από την ενεργοποιημένη PI3K (η ποιο σωστά από την PDK1). Οι πυραζολοπυριμιδίνες είναι σε θέση να αναστείλουν και την Thr308 φωσφορυλίωση της Akt αλλά σε πολύ μεγαλύτερες δόσεις, με μια διαδικασία που εξαρτάται απόλυτα από την αναστολή της φωσφορυλίωσης στη θέση Ser473. Επίσης αναστέλλουν και όλες τις γνωστές λειτουργίες του mTORC1, οπότε θεωρούνται ειδικοί αναστολείς της mTOR είτε αυτή βρίσκεται υπό τη μορφή mTORC1 είτε υπό τη μορφή mTORC2. Σε in vivo πειράματα φάνηκε ότι η Ser473 φωσφορυλίωση στο λιπώδη και ηπατικό ιστό εξαρτάται απόλυτα από την ακεραιότητα του mTORC2 αλλά στο μυϊκό ιστό πρέπει να εμπλέκεται μια άλλη κινάση η DNA-PK. Τα δεδομένα αυτά να αναιρούν την

υπόθεση ότι η PDK2 είναι η mTOR καθώς ενδέχεται η PDK2 να είναι διαφορετικό μόριο στους διάφορους ιστούς <sup>76</sup>.

Η δεύτερη φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Ser473 θεωρείται ότι αυξάνει την ενεργότητα της κατά πέντε φορές <sup>77</sup>. Η πλήρως ενεργοποιημένη Akt, αναστέλλει το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της οζώδους σκλήρυνσης TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis complex 1 και tuberous sclerosis complex 2). Το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του mTORC1 και ως εκ τούτου η αναστολή του από την Akt προκαλεί έμμεσα ενεργοποίηση του mTORC1 <sup>78</sup>. Η Akt είναι όμως σε θέση να ενεργοποιήσει το mTORC1 και άμεσα, προκαλώντας φωσφορυλίωση της mTOR στη θέση Ser2448. Η μεμονωμένη φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Thr308 (σε κύτταρα MEF mSIN<sup>-/-</sup> που δεν έχουν Ser473pAkt λόγω απώλειας του mTORC2) διατηρεί την ικανότητά της να φωσφορυλιώνει το TSC1/TSC2 και την GSK3 (παρεμβαίνοντας έτσι στο μονοπάτι Wnt), αλλά καταργεί την ικανότητά της να φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη FoxO στον πυρήνα των κυττάρων <sup>76</sup>.

Οι πρωτεΐνες TSC1 (hamartin) και TSC2 (tuberin) κωδικοποιούνται από δυο διαφορετικά γονίδια, ο μεταλλάξεις των οποίων σχετίζονται με την εμφάνιση της οζώδους σκλήρυνσης. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως ετεροδιμερές, αφού η υπερέκφραση μόνο της μιας από τις δυο δεν αλλάζει το φαινότυπο. Το σύμπλεγμα αυτών των πρωτεϊνών βρίσκεται ενδιάμεσα της Akt και της S6K στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Η Akt φωσφορυλιώνει άμεσα το TSC2. Η απαλοιφή της TSC2 σε κύτταρα HEK-293 προκαλεί μόνιμη φωσφορυλίωση της S6K και 4EBP1, η οποία αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη, ενώ η υπερέκφραση του συμπλέγματος TSC1/TSC2 στα ίδια κύτταρα αναστέλλει την από την ινσουλίνη επαγόμενη φωσφορυλίωση της S6K και 4EBP1. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι ένας από τους μηχανισμούς ενεργοποίησης της mTOR από την Akt είναι η φωσφορυλίωση και αδρανοποίηση του TSC1/TSC2 <sup>79</sup>. Η φωσφορυλίωση της TSC2 από την Akt πιθανόν να αποσταθεροποιεί το σύμπλεγμα TSC1/TSC2, οδηγώντας σε αποδόμηση των συστατικών του, άρση της ανασταλτικής του δράσης επί του mTORC1, ενεργοποίηση αυτού και τελικά φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών S6K & 4EBP1 (εικόνα 13) <sup>80</sup>.



**Εικόνα 13:** Η ρύθμιση της δραστηριότητας της mTOR από αυξητικούς παράγοντες μεσολαβείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt. Η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την TSC2 αυξάνοντας έτσι την GTP-Rheb που είναι ο τελικός ενεργοποιητής της mTOR με ένα άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό. Επιπρόσθετα η TSC2 ενεργοποιείται από την κινάση AMPK που αποτελεί αισθητήρα της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου. Από: Hay N et al 2004

Η απαλοιφή της Akt1 και Akt2 δεν προκαλεί σημαντική μείωση της φωσφορυλιωμένης TSC2<sup>81</sup>, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της παρουσίας πρόσθετων μηχανισμών είτε για τη φωσφορυλίωση της TSC2, είτε για τη ρύθμιση του mTORC1 από την Akt. Άλλωστε, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η Akt μπορεί να προκαλέσει άμεσα ενεργοποίηση του mTORC<sup>74</sup>, μέσω φωσφορυλίωσης της mTOR στη θέση Ser2448. Το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 επίσης συμβάλει σημαντικά στην ενεργοποίηση του mTORC2, καθώς η αναστολή της λειτουργικότητας του TSC1/TSC2 σε διάφορες κυτταρικές σειρές, προκάλεσε την πλήρη αναστολή της φωσφορυλίωσης της Akt στη θέση Ser473 από το mTORC2. Οι παρατηρήσεις αυτές συνηγορούν ότι το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του mTORC1 και θετικό ρυθμιστή του mTORC2<sup>82</sup>.

Η απώλεια οιασδήποτε από τις πρωτεΐνες TSC προκαλεί αυξημένη ενεργοποίηση του mTORC1 ακόμα και επί απουσίας των υπερκείμενων σημάτων που φυσιολογικά

απαιτούνται για τη διατήρηση της δραστηριότητας του μονοπατιού PI3K/Akt/mTORC1. Εξαίρεση αποτελεί η διαθεσιμότητα αμινοξέων, καθώς το μονοπάτι του mTORC1 αναστέλλεται ακόμα και σε κύτταρα τα οποία στερούνται είτε το TSC1 είτε το TSC2. Φαίνεται πως ανεξάρτητα από την παρουσία αυξητικών παραγόντων, ινσουλίνης, ή ενεργοποιημένων πρωτεϊνών του σηματοδοτικού μονοπατιού (πχ PI3K, pAkt, TSC1/2, GTP-Rheb) το mTORC1 είναι αδύνατον να ενεργοποιηθεί όταν υπάρχει έλλειψη αμινοξέων<sup>83</sup>.

Η μικρή GTP-συνδεόμενη πρωτεΐνη Rheb (Ras homolog enriched in brain) έχει επιστατικό ρόλο ανάμεσα στο TSC1/TSC2 και στο mTORC1. Όταν η Rheb βρίσκεται υπό τη μορφή GTP-Rheb ενεργοποιεί το mTORC1 ενώ υπό τη μορφή GDP-Rheb το αναστέλλει. Το TSC1/TSC2 λειτουργεί ως GTPase (GAP) για την πρωτεΐνη Rheb μετατρέποντας την GTP μορφή σε GDP-Rheb και ως εκ τούτου αναστέλλει έμμεσα τη δραστηριότητα του mTORC1. Η αναστολή της GAP δραστηριότητας του TSC1/TSC2 από την Akt, αυξάνει την διαθέσιμη GTP-Rheb και ενεργοποιεί το mTORC1<sup>84</sup>. Επί απουσίας αμινοξέων το mTORC1 εντοπίζεται διάσπαρτο στο κύτταρο και η χορήγηση αμινοξέων γίνεται αντιληπτή από GTP-συνδέουσες πρωτεΐνες της οικογένειας Ras (Rag a, b, c, d). Οι πρωτεΐνες Rag αφενός ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια τακτοποίηση των περμεασών των αμινοξέων και την αυτοφαγία και αφετέρου προκαλούν μετανάστευση του mTORC1 σε πρώιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα. Όταν το mTORC1 μετακινείται στις θέσεις αυτές, «συναντά» την GTP-Rheb και δύναται να ενεργοποιηθεί<sup>85</sup>.

Κατά τη διέγερση του κυττάρου από αυξητικούς παράγοντες παρατηρείται ενεργοποίηση της φωσφορολιπάσης D1 (PLD1) μέσω της μικρής GTPase Cdc42. Η ενεργοποίηση της PLD1 αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φωσφατιδικού οξέως (ΦΟ). Το ΦΟ συνδέεται στο FRB τμήμα της mTOR και την ενεργοποιεί. Δεν είναι σαφές αν η ενεργοποίηση της mTOR από το ΦΟ λαμβάνει χώρα σε κάποιο σημείο του κλασσικού μονοπατιού ενεργοποίησης ή επιτελείται με ανεξάρτητο μηχανισμό<sup>85</sup>.



### 4.3.3 Η ρύθμιση της mTOR από την ενέργεια

Η ενεργειακή επάρκεια του κυττάρου καταγράφεται συνεχώς από την AMPK, η οποία στη συνέχεια καθορίζει τη ροή ενέργειας είτε προς την κατεύθυνση της πρωτεϊνοσύνθεσης (αναστολή της TSC2 και ενεργοποίηση της mTOR), είτε προς την κατεύθυνση της παραγωγής ενέργειας (ATP) κάτι που συνεπάγεται την αναστολή της mTOR και της πρωτεϊνοσύνθεσης <sup>86</sup>. Η ενεργοποιημένη AMPK φωσφορυλιώνει άμεσα την TSC2 στη θέση Ser1345 και επιτρέπει τη περαιτέρω φωσφορυλίωση της TSC2 σε θέσεις σερίνης από την GSK3β, διαφορετικές από αυτές που φωσφορυλιώνονται από άλλες κινάσες <sup>88</sup>. Οι φωσφορυλιώσεις αυτές ενεργοποιούν το TSC1/TSC2 και καταστέλλουν το mTORC1. Ο μηχανισμός όμως ελέγχου του mTORC1 από τη γλυκόζη και το οξυγόνο διατηρείται σε όλα τα είδη, ακόμη και σε εκείνα που στερούνται τα TSC1/TSC2. Σε κύτταρα με ανεπάρκεια της TSC2 παρατηρείται μερική ευαισθησία της mTOR στη στέρηση ενέργειας. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται ίσως από το γεγονός ότι η AMPK δύναται να φωσφορυλιώνει άμεσα (χωρίς παρεμβολή της TSC2) την mTOR στη θέση Thr2446 στο NRD τμήμα, περιορίζοντας έτσι την δυνατότητα της Akt να φωσφορυλιώνει την mTOR στη θέση Ser2448. Υπάρχουν δεδομένα ότι ισχύει και το αντίστροφο, δηλαδή η φωσφορυλίωση στη θέση Ser2448 από την Akt καταργεί τη δυνατότητα της AMPK να αναστείλει την mTOR με φωσφορυλίωση στη θέση Thr2446. Επομένως οι δύο φωσφορυλιώσεις είναι «ανταγωνιστικές» με την έννοια ότι η μια αποκλείει την άλλη <sup>88</sup>. Τέλος η AMPK μπορεί να αναστείλει άμεσα την Raptor με φωσφορυλίωση στη θέση Ser792, η οποία προάγει τη σύνδεση της με πρωτεΐνες 14-3-3 και την αποδόμησή της με τελικό αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του mTORC1 <sup>86</sup>.

Εκτός από τη μακροχρόνια υποξία, ακόμα και η σύντομη στέρηση οξυγόνου μπορεί να αναστείλει τη δράση του mTORC1 και να περιορίσει την κατανάλωση ενέργειας από ενεργοβόρες διαδικασίες όπως η πρωτεϊνοσύνθεση. Στο μηχανισμό της ταχείας αναστολής του mTORC1 από την οξεία υποξία εμπλέκεται ο επαγόμενος από την υποξία παράγων 1α [hypoxia inducible factor 1α (HIF1α)]. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας και επάγει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων όπως το REDD1, γνωστό και ως DDIT4. Η πρωτεΐνη REDD1 ανταγωνίζεται το TSC2 για τη σύνδεσή του με την ανασταλτική πρωτεΐνη 14-3-3. Έτσι σε συνθήκες υποξίας η αύξηση της REDD1 απελευθερώνει την TSC2 από την 14-3-3 και επιτρέπει την αναστολή του mTORC1 από το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 <sup>89</sup>.

#### 4.3.4 Η ρύθμιση της mTOR από τις MAP κινάσες και τον TNFα

Η δραστηριότητα του mTORC1 ελέγχεται από το μονοπάτι Ras-ERK-RSK το οποίο φαίνεται ότι λειτουργεί παράλληλα με το κλασσικό πλέον μονοπάτι PI3K–Akt και κατευθύνει διάφορα ενδοκυττάρια μηνύματα προς το mTORC1. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού ξεκινά με τη σύνδεση κυτταροκινών, αυξητικών και άλλων μιτογόνων παραγόντων, με υποδοχείς οι οποίοι συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs). Η ενεργοποίηση των GPCRs προκαλεί κινητοποίηση του μονοπατιού Ras-ERK-RSK. Η ενεργοποίηση της ERK (extracellular signal regulated kinase) και της RSK (p90 ribosomal S6 kinase) προκαλεί ανασταλτική φωσφορυλίωση της TSC2 στις θέσεις Ser664 και Ser1798 αντίστοιχα. Οι φωσφορυλίώσεις αυτές λειτουργούν αθροιστικά με τις ανασταλτικές φωσφορυλίώσεις που προέρχονται από την Akt. Η RSK εκτός από αναστολή του TSC2, μπορεί και άμεσα να προκαλέσει και ενεργοποίηση του mTORC1 με φωσφορυλίωση του raptor σε θέσεις Ser 719-721-722<sup>90</sup>.

Επαγωγή της δραστηριότητας της mTOR1 μπορεί να γίνει και από κυτταροκίνες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )). Η κινάση IKK $\beta$  (inhibitor of nuclear factor $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) kinase- $\beta$ ; γνωστή και ως IKKB), που αποτελεί σημαντικό συστατικό στοιχείο του σηματοδοτικού μονοπατιού του TNF $\alpha$ , δύναται να φωσφορυλιώνει το TSC1 στη θέση Ser487 και Ser511, με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης του TSC1/TSC2 και την ενεργοποίηση του mTORC1. Επιπρόσθετα ο TNF $\alpha$  μπορεί να ενεργοποιήσει απευθείας την Akt η οποία επάγει την κινάση IKK $\alpha$  και η οποία με τη σειρά της επάγει το mTORC1. Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι η IKK $\alpha$  είναι απαραίτητη σε ορισμένες καρκινικές σειρές για την ενεργοποίηση του mTORC1 από την Akt αποτελώντας ενδιάμεσο σταθμό μεταξύ Akt και mTORC. Παραμένει ωστόσο άγνωστος ο μηχανισμός με τον οποίο η IKK $\alpha$  προκαλεί την ενεργοποίηση του mTORC1<sup>91</sup>.

## **5. Φαρμακολογία της ραπαμυκίνης (rapamycin ή sirolimus) και καθιερωμένες κλινικές εφαρμογές**

### **5.1 Μηχανισμός δράσης**

Στα λεμφοκύτταρα η ραπαμυκίνη ασκεί τη δράση της μετά το σχηματισμό ενός συμπλέγματος με τον ενδοκυττάριο δέκτη της, την FK506-δεσμευτική πρωτεΐνη (FKBP12). Το σύμπλεγμα FKBP12-ραπαμυκίνης συνδέεται με το καρβοξυτελικό άκρο της mTOR (FRB τμήμα), αναστέλλοντας τη δραστηριότητά της. Η αναστολή της mTOR διακόπτει τη μετάδοση του σήματος της ιντερλευκίνης 2 (IL-2), με αποτέλεσμα την επίσχεση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 - S. Η ραπαμυκίνη αναστέλλει την ενεργοποίηση των T και B-λεμφοκυττάρων από κυτταροκίνες με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και του πολλαπλασιασμού<sup>92</sup>.

Η ραπαμυκίνη αναστέλλει επίσης τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων<sup>93</sup> καθώς και των ενδοθηλιακών κυττάρων, τόσο των αγγείων, όσο και των λεμφαγγείων. Τέλος αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε πολλές καρκινικές σειρές (προστάτης, μαστός, νεφρά) καθώς και την ανάπτυξη των αγγειομυολιπωμάτων της οζώδους σκλήρυνσης<sup>99</sup>.

### **5.2 Φαρμακοκινητική**

Η ραπαμυκίνη διατίθεται σε στερεά μορφή και απορροφάται άμεσα από το γαστρεντερικό σωλήνα με χρόνο εμφάνισης της μέγιστης συγκέντρωσης στο αίμα σε μία περίπου ώρα μετά τη χορήγηση της, όταν χορηγείται μια δόση και δυο ώρες όταν χορηγούνται πολλές δόσεις, σε ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού. Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά της η οποία ανέρχεται περίπου στο 14% μετά τη λήψη της από το στόμα, οφείλεται στο γρήγορο μεταβολισμό που επιτελείται στο συκώτι και στο έντερο. Η βιοδιαθεσιμότητά της μειώνεται με την κατανάλωση λιπαρών γευμάτων, ενώ για να ελαχιστοποιηθεί η μεταβλητότητά της πρέπει να λαμβάνεται πριν ή μετά το φαγητό. Εξαιτίας του μεγάλου χρόνου της ημίσειας ζωής της, η ραπαμυκίνη χορηγείται σε μια δόση καθημερινά<sup>95</sup>.

Η ραπαμυκίνη έχει ευρεία κατανομή σε όλα τα συστατικά του αίματος με το ελεύθερο κλάσμα στο αίμα ανέρχεται περίπου στο 8%. Το 40% του φαρμάκου συνδέεται με τα λιποπρωτεϊνικά συστατικά του πλάσματος και το 60% συνδέεται με τα μη λιποπρωτεϊνικά συστατικά του πλάσματος. Ο μέσος όγκος κατανομής της ραπαμυκίνης στο αίμα είναι 12 L/kg <sup>96</sup>. Η υψηλότερη συγκέντρωση του φαρμάκου απαντάται στα ερυθρά αιμοσφαίρια (95%) και ακολουθεί το πλάσμα (3%), τα λεμφοκύτταρα (1%) και τα κοκκιοκύτταρα (1%). Η συνήθης αναλογία συγκέντρωσης μεταξύ ολικού αίματος και πλάσματος είναι 30/1, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρούνται σε καρδιά, έντερο, νεφρούς, ήπαρ, σπλήνα, μύες, πνεύμονες και όρχεις <sup>96</sup>.

### 5.3 Μεταβολισμός

Ο μεταβολισμός της ραπαμυκίνης επιτελείται στο ήπαρ με τη βοήθεια του κυτοχρώματος P450 3A4 και της P-γλυκοπρωτεΐνης <sup>95</sup>. Ο μεταβολισμός αυτός έχει ως συνέπεια, η ραπαμυκίνη να μεταβολίζεται σε ένα πλήθος παραγώγων, όπως είναι η υδρόξυ-ραπαμυκίνη, η μεθυλ-ραπαμυκίνη και η υδρόξυ-μεθυλ-ραπαμυκίνη. Παράγωγο της ραπαμυκίνης είναι η 40-O-(2-υδρόξυλ-έθυλ-ραπαμυκίνη) ή everolimus (RAD) <sup>96</sup>. Η 40-O-(2-υδρόξυλ-έθυλ-ραπαμυκίνη) αποβάλλεται κατά 91% στα κόπρανα και μόνο κατά 2% στα ούρα. Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 57 έως 63 ώρες, γεγονός που επιτρέπει την άπαξ ημερήσια χορήγηση <sup>97</sup>.

Οι Lampen και συν (1998) μελέτησαν τον μεταβολισμό του φαρμάκου, όταν αυτό διέρχεται από το λεπτό έντερο ανθρώπων και ζώων, χρησιμοποιώντας μικροσώματα του λεπτού εντέρου στο εργαστήριο. Με τη βοήθεια χρωματογραφίας παρατηρήθηκαν οι μεταβολίτες: η υδρόξυ-ραπαμυκίνη, η διυδρόξυ-ραπαμυκίνη, η τριυδροξυ-ραπαμυκίνη, η δυσμεθυλ-ραπαμυκίνη και η διδεσμεθυλ-ραπαμυκίνη, οι οποίοι είναι όμοιοι με αυτούς που απαντώνται στο συκώτι. Η παρατήρηση αυτή συνηγορεί στην ύπαρξη στο λεπτό έντερο του κυτοχρώματος P450 3A4, η οποία θα μπορούσε να εξηγήσει τη μεγάλης μεταβλητότητα στην απορρόφηση του φαρμάκου <sup>96,97</sup>.

#### 5.4 Ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της ραπαμυκίνης, όσον αφορά το αναπνευστικό σύστημα είναι πνευμονία από άτυπα στελέχη, μη λοιμώδης διάμεση πνευμονίτιδα, βρογχολίτιδα, αποφρακτική βρογχολίτιδα προκαλούσα πνευμονία (BOOP), λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα και νεκρωτική αγγειίτιδα, με προέχουσες εκδηλώσεις τη δύσπνοια, βήχα, πυρετό και αιμόπτυση. Φυσικά στα πλαίσια της ανοσοκαταστολής δεν μπορεί να αποκλειστεί κάθε είδους λοίμωξη από βακτήρια, μύκητες ή ακόμα και πρωτόζωα <sup>98,99</sup>.

Σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια αποτελεί η καθυστέρηση στην επούλωση του χειρουργικού τραύματος (περίπου στο 20%-50%) ασθενών που έχουν υποστεί μεταμόσχευση νεφρού και λαμβάνουν ραπαμυκίνη <sup>100</sup>. Σε ασθενείς με μεταμόσχευση ήπατος έχει παρατηρηθεί αυξημένη συχνότητα θρόμβωσης της ηπατικής αρτηρίας, απώλεια του μοσχεύματος και θάνατος <sup>102</sup>. Επίσης αυξημένη πιθανότητα λεμφοκηλών, οιδήματος κάτω άκρων και δυσμενής έκβαση του μοσχεύματος στη πρώτη περίοδο του μοσχεύματος σε σχέση με αυτούς που ελάμβαναν αναστολείς της καλσινευρίνης <sup>111</sup>.

Άλλη σημαντική επιπλοκή είναι η υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία η οποία συνοδεύεται από χαμηλά επίπεδα σιδήρου στο αίμα, παρά την υψηλή φερριτίνη και τα υψηλά επίπεδα C αντιδρώσας πρωτεΐνης <sup>102</sup>. Θρομβοπενία παρατηρείται στο 13-30% των ασθενών, συνήθως την 9η με 10η μέρα μετά την έναρξη χορήγησης της, είναι δοσοεξαρτώμενη και υποχωρεί στις 2 εβδομάδες μετά τη διακοπή του φαρμάκου. Λευκοπενία παρατηρείται 2 εβδομάδες μετά την έναρξη της ραπαμυκίνης, δεν είναι δοσοεξαρτώμενη και αποκαθίσταται μετά τη διακοπή. Τέλος σε συγχορήγηση ραπαμυκίνης-κυκλοσπορίνης, με τα επίπεδα των φαρμάκων στον ορό υπερβαίνουν τα επιθυμητά, έχει αναφερθεί θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια σε ποσοστό 20% η οποία είναι πλήρως αναστρέψιμη μετά την μείωση των επιπέδων <sup>96</sup>.

Άλλη ανεπιθύμητη ενέργεια της ραπαμυκίνης είναι η υπερλιπιδαιμία και η υπερχοληστεριναιμία η οποία παρατηρείται στο 44% των ασθενών. Η δυσλιπιδαιμία της ραπαμυκίνης είναι δοσοεξαρτώμενη και οφείλεται στην αναστολή της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Η συγχορήγηση ραπαμυκίνης σε μικρή δόση με μυκοφαινολάτη μοφετίλ περιορίζει τον κίνδυνου δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας <sup>102</sup>.

Από το γαστρεντερικό παρατηρείται δυσκοιλιότητα (28-36%), διάρροια (25-42%), δυσπεψία (17-25%), ναυτία (25-36%) και έμετοι (19-25%). Σπανιότερα παρατηρούνται εξελκώσεις σε κάποιο σημείο του γαστρεντερικού σωλήνα (από το στόμα μέχρι το ορθό) <sup>104</sup>.

Η πρωτεϊνουρία είναι μια άλλη ανεπιθύμητη ενέργεια της ραπαμυκίνης. Η χορήγηση ραπαμυκίνης σε μεταμοσχευμένους ασθενείς που προηγουμένως ελάμβαναν αναστολείς της καλσινευρίνης είχε ως αποτέλεσμα σπειραματική βλάβη (εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, ΕΤΣΣ) και πρωτεϊνουρία μετά από δυο ως εννέα μήνες θεραπείας. Όταν ο αναστολέας της καλσινευρίνης επαναχορηγήθηκε και διακόπηκε η ραπαμυκίνη η κατάσταση αντιστράφηκε <sup>105</sup>. Πιθανοί μηχανισμοί για την πρόκληση πρωτεϊνουρίας από τη ραπαμυκίνη θεωρούνται η μείωση της σωληναριακής επαναρρόφησης των διηθούμενων πρωτεϊνών, η δυσλειτουργία των ποδοκυττάρων, η άρση της αιμοδυναμικής επίδρασης των αναστολέων καλσινευρίνης και η υπερπαραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) ο οποίος αυξάνει τη διαπερατότητα του αγγειακού τοιχώματος και προκαλεί ρικνωτική ΕΤΣΣ, μολονότι η ραπαμυκίνη είναι ισχυρός αναστολέας του VEGF <sup>101,102</sup>. Επιπλέον αναφέρεται ότι η ραπαμυκίνη λόγω της αντιυπερπλαστικής της δράσης προκαλεί σωληναριακή βλάβη με απόπτωση των σωληναριακών κυττάρων, η οποία μπορεί να προσομοιάζει με την νεφροπάθεια από κυλίνδρους (cast nephropathy), ιδιαίτερα όταν χορηγείται σε συνδυασμό με αναστολείς της καλσινευρίνης. Στη σωληναριακή βλάβη αποδίδεται και ένα σύνδρομο τύπου Fanconi το οποίο χαρακτηρίζεται από υποκαλιαιμία-υποφωσφαταιμία <sup>111</sup>.

Η ραπαμυκίνη αντενδεικνύεται στην εγκυμοσύνη διότι έχει συνδεθεί με τερατογενέσεις και η χορήγηση της πρέπει να διακόπτεται τουλάχιστον 12 εβδομάδες πριν από την προσπάθεια για σύλληψη. Υπάρχουν επίσης στοιχεία που δείχνουν ότι η ραπαμυκίνη μειώνει τη σπερματογένεση στο 1/10 του φυσιολογικού <sup>111</sup>.

Η συνδυασμένη χορήγηση ραπαμυκίνης-κυκλοσπορίνης μειώνει ή εξαλείφει τη νεφροτοξικότητα, ιδιαίτερα σε ασθενείς στους οποίους έχει μεσολαβήσει μεγάλο χρονικό διάστημα από τη μεταμόσχευση. Σε ασθενείς στους οποίους έγινε μετάβαση από τριπλό σχήμα κυκλοσπορίνη-μυκοφαινολικό-στεροειδή σε ραπαμυκίνη-μυκοφαινολικό-στεροειδή παρατηρήθηκε βελτίωση της νεφρικής λειτουργίας, μικρότερο ποσοστό χρόνιας νεφροπάθειας του μοσχεύματος, καλύτερη ρύθμιση της

υπέρτασης και της γλυκόζης και μικρότερο ποσοστό νεοπλασιών αλλά και απορρύθμιση του λιπιδαιμικού προφίλ καθώς και πρωτεϊνουρία, η οποία ήταν απύσασ με τους αναστολείς της καλσινευρίνης<sup>111</sup>.

Άλλες επιπλοκές αφορούν το καλυπτήριο σύστημα όπως ακμή, θυλακίτιδα στο τριχωτό της κεφαλής, πυώδης ιδραδενίτιδα αφθώδης στοματίτιδα και σπανιότερα λευκοκλαστική αγγειίτιδα<sup>96,108</sup>.

### 5.5 Φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις

Όπως είναι γνωστό η κυκλοσπορίνη και η ραπαμυκίνη δρουν στον ίδιο κυτταρικό υποδοχέα τον FKBP12. Προβληματίζει λοιπόν το γεγονός αν η συγχορήγηση τους επιτείνει την αναστολή πολλαπλασιασμού των Β και Τ λεμφοκυττάρων. Μελέτες σε ποντίκια και πιθήκους in vitro δεν μπόρεσαν να δώσουν ξεκάθαρη απάντηση λόγω της παρουσίας άφθονου υποστρώματος FKBP12<sup>109</sup>. Ωστόσο σε in vivo μελέτες με φαρμακολογικές δόσεις ραπαμυκίνης δεν υπήρξαν ενδείξεις συναγωνιστικής αναστολής με την τακρολίμη. Η χρονική απόσταση που μεσολαβεί μεταξύ της χορήγησης τακρολίμης και ραπαμυκίνης δεν επιδρά στα επίπεδα των δύο φαρμάκων<sup>59,110</sup>.

Γενικότερα, η συγχορήγηση της ραπαμυκίνης με επαγωγείς του κυτοχρώματος P450 3A4 στο έντερο, όπως μερικά αντιεπιληπτικά, η ριφαμικίνη, η ισονιαζίδη και το χόρτο του Αγίου Ιωάννη ή αναστολείς του κυτοχρώματος, όπως είναι οι αζόλες, οι αναστολείς ασβεστίου, οι μακρολίδες, ινδιναβίρη και το γκρέιπφρουτ μπορεί να προκαλέσει σοβαρές μεταβολές των επιπέδων στο αίμα. Ταυτόχρονη χορήγηση της ραπαμυκίνης με κυκλοσπορίνη αυξάνει δραστικά τα πριν, τα μετά τη χορήγηση και τα μέσα επίπεδα καθώς και την επιφάνεια κάτω από τη καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου της ραπαμυκίνης, σε σύγκριση με τη χορήγηση των δύο φαρμάκων με χρονική απόσταση τεσσάρων ωρών ή τη χορήγηση ραπαμυκίνης χωρίς κυκλοσπορίνη<sup>110</sup>.

Επίσης ο συνδυασμός μυκοφαινολικού-ραπαμυκίνης αυξάνει τα επίπεδα του μυκοφαινολικού σε σχέση με το συνδυασμό μυκοφαινολικού-αναστολέα καλσινευρίνης οπότε πρέπει να προσαρμόζεται η δόση του μυκοφαινολικού σε χαμηλότερα επίπεδα<sup>96</sup>.

## **6. Θεραπευτικές εφαρμογές της ραπαμυκίνης σε νεφρικές παθήσεις πέραν της μεταμόσχευσης νεφρού**

Η ραπαμυκίνη διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση και στο μέγεθος του οργάνου που μεταμοσχεύεται. Οι εξωκυττάριοι παράγοντες που αποτελούν εκτός των άλλων και ρυθμιστές του μηχανισμού δράσης τους είναι ο αυξητικός παράγοντας, τα θρεπτικά συστατικά όπως είναι τα αμινοξέα και η γλυκόζη, καθώς και τα ενδοκυττάρια σήματα, όπως είναι τα επίπεδα AMP/ATP μέσω της AMP-ενεργοποιημένης πρωτεΐνης κινάσης (AMP-activated protein kinase, AMPK). Η AMPK ενεργοποιείται, μετά από εξάντληση του ενδοκυττάριου ATP και αύξηση του ενδοκυττάριου AMP, όπως στην περίπτωση στέρησης της γλυκόζης, της υποξίας, της ισχαιμίας και του θερμικού σοκ. Η ενεργοποίηση της AMPK καταστέλλει την ενεργοποίηση του TORC1 <sup>112</sup>.

Εκτός από την ανοσοκατασταλτική της δράση η ραπαμυκίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση και τη φλεγμονή. Σε σχέση με την αγγειογένεση, ο rapTOR αλληλεπιδρά άμεσα και ρυθμίζει τη δραστηριότητα του παράγοντα που παράγεται κατά την υποξία (HIF)-1α, που με τη σειρά του ελέγχει τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor, VEGF). Επίσης, η ραπαμυκίνη μπορεί να παρουσιάζει και αντιφλεγμονώδη δράση η οποία είναι ανεξάρτητη από την δράση της στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος <sup>108</sup>. Για παράδειγμα θεραπευτικές συγκεντρώσεις ραπαμυκίνης (10 ng/ml) μειώνουν τη παραγωγή TNFα κατά 37% σε εγγύς σωληναριακά κύτταρα μετά από διέγερσή τους με IL-1 <sup>113</sup>.

Η ευαισθησία της αναστολής του TORC1 από τη ραπαμυκίνη εξαρτάται από τα διάφορα κύτταρα στόχο. Τα κύτταρα του ενδοθηλίου, οι ινοβλάστες, τα παρεγχυματικά κύτταρα των συμπαγών οργάνων, όπως είναι το ήπαρ και οι νεφροί, καθώς και τα κύτταρα του μυελού των οστών είναι ευαίσθητα στην αναστολή του TORC1 από τη ραπαμυκίνη. Παρά όλα αυτά ενώ σε ορισμένους τύπους κυττάρων, όπως είναι οι T κυτταρικοί κλώνοι και οι ινοβλάστες, η χορήγηση της ραπαμυκίνης αναστέλλει τη βασική και τη μιτογονοδιεγερτική δραστηριότητα της p70S6k. Τα μαστικά κύτταρα του μυελού των οστών απαιτούν πολλαπλάσια δόση ραπαμυκίνης



(100 nM) για καταστολή μόνο κατά 40% <sup>114</sup>. Επίσης, τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στην αντιμιτογονική επίδραση της ραπαμυκίνης, σε σχέση με τα ποδοκύτταρα. Είναι αρκετά ενδιαφέρον όμως ότι τα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα αναπτύσσουν μια επίκτητη αντοχή στην αντι-πολλαπλασιαστική δράση της ραπαμυκίνης, όταν εκτεθούν στο φάρμακο για περισσότερο από 72 ώρες <sup>115</sup>.

Ο μηχανισμός που καθορίζει την ευαισθησία και την αντίσταση στην ραπαμυκίνη δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος, αλλά θα μπορούσε να αφορά τα εξής:

(α). να εξαρτάται από την ικανότητα ορισμένων εξειδικευμένων κυττάρων να εισάγονται στον κυτταρικό κύκλο. Για παράδειγμα, το 40% των κυττάρων του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου να βρίσκονται διαρκώς στη φάση G1, έτοιμα να εισέλθουν σε κυτταρική διαίρεση <sup>116</sup>, ενώ αντιθέτως τα ποδοκύτταρα ως τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν <sup>117</sup>.

(β). τη σχετική επάρκεια της FKBP-12 (και/ή του raptor), καθώς και απαλοιφή αυτών οδηγεί σε παραγωγή μυκήτων, οι οποίοι ήταν ανθεκτικοί στη ραπαμυκίνη <sup>118</sup> και /ή

(γ). αντιρροπιστική αύξηση της ενεργότητας της Akt μετά από έκθεση στη ραπαμυκίνη λόγω κατάργησης της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης από την p70S6k στο IRS/PI3K <sup>119</sup>.

Οι παράγοντες που καθορίζουν, εάν η αναστολή του TORC1 έχει σχέση με την κυτταρική τοξικότητα, δηλαδή με την απόπτωση ή τη νέκρωση δεν έχουν ακόμα προσδιοριστεί. Η αναστολή του TORC1 από τη ραπαμυκίνη δε φαίνεται να προκαλεί κυτταρική τοξικότητα <sup>120</sup> οπότε φαίνεται ότι η κυτταροτοξικότητα της ραπαμυκίνης εξαρτάται από άλλους παράγοντες. Αυτοί μπορεί να περιλαμβάνουν:

(α). τη σχετική επάρκεια ή ανεπάρκεια των παραγόντων που συνδέονται με την επιβίωση των κυττάρων, ιδιαίτερα του αυξητικού παράγοντα <sup>121</sup>.

(β). την αλληλεπίδραση με άλλα φάρμακα, όπως είναι η κυκλοσπορίνη <sup>117</sup>.

(γ). την παρουσία κυτταρικών στρεσογόνων παραγόντων που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο DNA των κυττάρων, δεδομένου ότι η TORC1 επάγει την κυτταρική επιβίωση και επούλωση μετά από καταστροφικά συμβάματα για το DNA <sup>123</sup>.

(δ). τη ίδια τη δόση της χορηγούμενης ραπαμυκίνης<sup>124</sup>.

### 6.1 Η επίδραση της ραπαμυκίνης στο φυσιολογικό νεφρό

Αρχικά σε πειραματικά από ζωικά μοντέλα φάνηκε ότι η ραπαμυκίνη δεν επηρεάζει την αιμοδυναμική του σπειράματος ή τη νεφρική ιστοπαθολογία. Οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεγαλύτερες σε σχέση με τις αντίστοιχες που χορηγήθηκαν σε ανθρώπους. Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι η ραπαμυκίνη παρουσίαζε κάποια εκλεκτική τοξικότητα σε ορισμένα είδη τρωκτικών. Για παράδειγμα, σε αρουραίους Sprague–Dawley και σε αυτογενώς υπερτασικούς αρουραίους, προκαλεί 25% μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, ενώ δεν έχει καμία επίδραση σε αρουραίους του είδους Lewis. Η μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης στους φυσιολογικούς αρουραίους Sprague–Dawley δεν συνοδεύτηκε από ιστολογικές βλάβες, ενώ οι αυτογενώς υπερτασικοί αρουραίοι εμφανίστηκαν παρουσίασαν βλάβες στα σπειράματα και σωληναριακή ατροφία<sup>125</sup>.

Στο χοίρο, του οποίου τα νεφρά παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες με εκείνα του ανθρώπου, η ενδοφλέβια χορήγηση ραπαμυκίνης 0.4 mg/kg προκάλεσε μείωση στο ρυθμό σπειραματικής διήθησης και στο ρυθμό της νεφρικής ροής του πλάσματος κατά 10%<sup>126</sup>. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματα ευρίσκεται και μια μελέτη σε αρουραίους Sprague–Dawley<sup>127</sup>. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, μελέτες με μικροπαρακέντηση σε αρουραίους Wistar–Munich έδειξαν, ότι η χορήγηση μιας δόσης ραπαμυκίνης (5 mg/kg) μείωσε σε απομονωμένο σπείραμα το ρυθμό σπειραματικής διήθησης κατά 26% καθώς και το ρυθμό της νεφρικής ροής του πλάσματος. Αυτή η αιμοδυναμική αλλαγή αποδόθηκε στην αύξηση της αντίστασης τόσο στο προσαγωγό όσο και στο απαγωγό αρτηρίδιο. Η αύξηση των αντιστάσεων αίρετο μερικώς με χορήγηση L-αργινίνης<sup>128</sup>.

Η χορήγηση ραπαμυκίνης σε κουνέλια, μέχρι και 60 ημέρες δεν επηρέασε τη ρυθμό νεφρικής ροής του αίματος, την αρτηριακή πίεση ή την κρεατινίνη ορού, αλλά προκάλεσε μια ήπια σωληναριακή ατροφία και διάμεση ίνωση<sup>124</sup>. Υπάρχουν πολλά δεδομένα όσον αφορά την ικανότητα της ραπαμυκίνης να ασκεί επίδραση στην ανάπτυξη του νεφρού. Το μονοπάτι PI3K–Akt θεωρείται πιθανό ότι συμμετέχει στην οργανογένεση των σωληναρίων κατά την εμβρυική ζωή και τη λειτουργία των

πολυκυστινών<sup>130</sup>. Επίσης το TORC1 έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη του νεφρού στα θηλαστικά<sup>131</sup>, η δε χορήγηση ραπαμυκίνης επηρέασε το σχηματισμό των σωληναρίων. Πιθανή επίδραση της ραπαμυκίνης στη μορφολογία των ποδοκυττάρων δεν μπορεί να αποκλειστεί αφού στις παραπάνω μελέτες δεν έγινε ιστολογική εξέταση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο<sup>132</sup>.

Σε ότι αφορά την έρευνα της επίδρασης της ραπαμυκίνης στον ανθρώπινο νεφρό, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για λόγους βιοηθικής. Μία μελέτη αξιολόγησε τη νεφρική λειτουργία σε ασθενείς με φυσιολογικούς νεφρούς και ψωρίαση. Η χορήγηση ραπαμυκίνης (3 mg/kg) για οκτώ εβδομάδες δεν επηρέασε τη νεφρική λειτουργία (μοναδικό κριτήριο νεφρικής βλάβης χρησιμοποιήθηκε η κρεατινίνη ορού)<sup>128</sup>. Ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού στους οποίους χορηγήθηκε ραπαμυκίνη παρουσίασαν υποκαλιαιμία και υποφωσφαταιμία, ενώ στα ούρα μετρήθηκαν πρωτεΐνες οξείας νεφρικής βλάβης. Οι πληροφορίες αυτές όμως προέρχονται από μικρό αριθμό μελετών, για αυτό απαιτείται περαιτέρω μελέτη<sup>135</sup>.

Όπως προαναφέρθηκε η συγχορήγηση ραπαμυκίνης-κυκλοσπορίνης επιδεινώνει την τοξικότητα της κυκλοσπορίνης σε μεταμοσχευμένους και μη ασθενείς<sup>135</sup>. Η επιδείνωση αποδίδεται στην αύξηση της συγκέντρωσης της κυκλοσπορίνης στους ιστούς και το αίμα όταν τα δυο φάρμακα χορηγούνται μαζί καθώς και τα δύο μεταβολίζονται από το P4503A4 και τη P γλυκοπρωτεΐνη στο συκώτι, στο έντερο, καθώς και στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα<sup>136</sup>. Για αυτό το λόγο, η δόση της ραπαμυκίνης ή πρέπει να μειώνεται, όταν χορηγείται ταυτόχρονα με τη κυκλοσπορίνη ή να διακόπτεται η κυκλοσπορίνη εφόσον το επιτρέπει η νεφρική λειτουργία του ασθενούς και η ιστολογική εικόνα από τη βιοψία νεφρού. Επίσης έχει εξεταστεί και η αλληλεπίδραση της ραπαμυκίνης με τον άλλο αναστολέα της καλσινευρίνης της τακρολίμης. Οι πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι στους μεταμοσχευμένους, η συγχορήγηση ραπαμυκίνης και τακρολίμης μειώνει τη συγκέντρωση της τακρολίμης στο αίμα με μηχανισμό που ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί<sup>137</sup>.

Τέλος, η ραπαμυκίνη σπάνια έχει ενοχοποιηθεί για de novo θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια σε μεταμοσχευμένους και σε ασθενείς με υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παρά όλα αυτά, δεν είναι γνωστό, αν αυτό μπορεί να λάβει χώρα σε φυσιολογικό νεφρό<sup>138</sup>.

## 6.2 Η επίδραση της ραπαμυκίνης στους πολυκυστικούς νεφρούς

Η πολυκυστική νόσος των νεφρών (ADPKD) η οποία κληρονομείται με τον αυτοσωματικό επικρατή χαρακτήρα, είναι η πιο συχνή κληρονομική πάθηση των νεφρών και είναι υπεύθυνη για το 5% των ασθενών με τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής νόσου στο Δυτικό κόσμο <sup>139</sup>. Η νόσος χαρακτηρίζεται από την παρουσία χιλιάδων κύστεων μέσα στο νεφρικό παρέγχυμα, οι οποίες σχηματίζονται από έντονα πολλαπλασιαζόμενα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα. Οφείλεται σε μεταλλάξεις δύο διαφορετικών γονιδίων: του PKD1, το οποίο ευθύνεται για το 85% των περιπτώσεων και του PKD2 γονίδιο, το οποίο ευθύνεται για το 15% των περιπτώσεων. Η πολυκυστίνη-1 (PC1) είναι μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το PKD1 και αντιδρά με την τουμπερίνη, η οποία κωδικοποιείται από το Tsc2. Η κύρια δράση της τουμπερίνης είναι η απενεργοποίηση του TOR <sup>135</sup>. Σε πειραματικά ζωικά μοντέλα πολυκυστικής νεφρικής νόσου, τα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν τις νεφρικές κύστες παρουσιάζουν μεγάλη δραστηριότητα του TORC1, υποδηλώνοντας ότι η PC1 αναστέλλει τη δραστηριότητα του TOR μονοπάτι Akt/mTORC1 και η μεταλλαγμένη PC1 προκαλεί ανώμαλη ενεργοποίησή του <sup>141</sup>.

Η ραπαμυκίνη είχε θετική επίδραση σε πολλά ζωικά μοντέλα πολυκυστικής νόσου των νεφρών <sup>142,143</sup>, συμπεριλαμβανομένου και του ποντικίου Han:spr <sup>140</sup>, Tg737orpk/orpk και brk <sup>140</sup>. Ο κυτταρικός και μοριακός μηχανισμός των προστατευτικών επιδράσεων σε αυτά τα μοντέλα περιλαμβάνουν τη μείωση του μεγέθους των κύστεων και του πολλαπλασιασμού των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων <sup>140</sup>, τη μείωση των επιπέδων των φωσφορυλιωμένων p70S6K1 <sup>143</sup> και την αύξηση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών <sup>144</sup>. Η ραπαμυκίνη ήταν λιγότερο αποτελεσματική στην αναστολή της αύξησης των κύστεων στα θηλυκά Han:Sprd πολυκυστικά ποντίκια, τα οποία διέθεταν μια πιο ήπια νεφρική βλάβη από εκείνη των αρσενικών <sup>145</sup>.

Σε ότι αφορά τον άνθρωπο, ο αρχικός ενθουσιασμός από τα αποτελέσματα σε πειραματικά μοντέλα γρήγορα ακολούθηθηκε από απογοήτευση καθώς σε δύο τυχαιοποιημένες πολυκεντρικές μελέτες σε ανθρώπους, στους οποίους χορηγήθηκε σιρολίμη και εβερολίμη αντίστοιχα δεν παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της νεφρικής λειτουργίας στην πρώτη ή του μεγέθους των κύστεων στη δεύτερη <sup>146,147</sup>.

### 6.3 Επίδραση της ραπαμυκίνης στον καρκίνο του νεφρού

#### 6.3.1 Διαυγοκυτταρικός νεφρικός καρκίνος

Στον καρκίνο του νεφρού αυξάνεται η έκφραση του HIF1α και VEGF που είναι στόχοι του TORC1, επομένως η θεραπεία με αναστολείς του TORC1, όπως είναι η ραπαμυκίνη, μπορεί να έχει θεραπευτικά οφέλη. Ο διαυγοκυτταρικός καρκίνος που αποτελεί μια από τις πιο συχνές μορφές καρκίνου του νεφρού, χαρακτηρίζεται από τη σποραδική μείωση της λειτουργίας του γονιδίου Hippel-Lindau (VHL) σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των περιπτώσεων. Το γονίδιο VHL είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της πρωτεΐνης (p VHL), η οποία είναι σημαντική για τον έλεγχο της απόκρισης των ιστών στην υποξία. Σε φυσιολογικά κύτταρα, η υποξία προκαλεί την παραγωγή του HIF1α. Αυτός με τη σειρά του μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου, με αποτέλεσμα την μεταγραφή πλήθους γονιδίων που είναι υπεύθυνα για πρωτεΐνες, σημαντικές για την ανάπτυξη των αγγείων και την μεταφορά του οξυγόνου, όπως είναι ο VEGF, η ερυθροποιητίνη, ο προερχόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας και ο TGFα<sup>147</sup>.

Σε φυσιολογικά κύτταρα ο HIF1α σχηματίζει σύμπλοκο με την p VHL. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ουβικουτίνωση και πρωτεασωματική αποδόμηση του HIF1α. Τα διαυγοκυτταρικά καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν να αποδομήσουν τον HIF1α, τόσο σε φυσιολογική μερική τάση οξυγόνου, όσο και σε υποξία, με αποτέλεσμα την παραγωγή του VEGF καθώς και των αγγειοποιητικών παραγόντων. Παρ'όλα αυτά, η συγκεκριμένη δράση του αναστολέα του TORC1 στα καρκινικά νεφρικά κύτταρα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, αλλά πιθανόν να οφείλεται στις ανασταλτικές επιδράσεις του στην αγγειογένεση, καθώς και σε άμεσες επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων<sup>147</sup>.

Μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα της ραπαμυκίνης στη θεραπεία του καρκίνου του νεφρού. Η χορήγηση ραπαμυκίνης (10 ng/ml) *in vitro* σχετίστηκε με την αύξηση της έκφρασης της Ecadherin, της p27 kip1 και της μείωσης της cyclin D1 με αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων στη φάση G1/S. Η ραπαμυκίνη ανέστειλε την ανάπτυξη των υποδορίων εμφυτευόμενων όγκων σε ποντικούς BALB/c, όπως και την πνευμονική μετάσταση σε ζωικά μοντέλα ποντικών με ανθρώπινο καρκίνο του νεφρού<sup>148</sup>.

Αν και η δράση της ραπαμυκίνης δεν έχει αξιολογηθεί πλήρως στον ανθρώπινο καρκίνο του νεφρού, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες με τη τεμσερολίμη η οποία είναι ένας υδατοδιαλυτός εστέρας της ραπαμυκίνης. Σε μια από τις μεγαλύτερες κλινικές δοκιμές που έχουν γίνει, οι 626 ασθενείς με καρκίνο του νεφρού έλαβαν είτε θεραπεία με ιντερφερόνη Α, είτε με τεμσερολίμη είτε με συνδυασμό αυτών των φαρμάκων. Η ομάδα που έλαβε τεμσερολίμη είχε μέση επιβίωση 10.9 μήνες έναντι των 7.3 μηνών αυτών που έλαβαν ιντερφερόνη Α και 8.4 μηνών αυτών που έλαβαν συνδυασμό των δύο σκευασμάτων. Η διαφορά στη μέση επιβίωση ανάμεσα στην ομάδα που έλαβε μονοθεραπεία με τεμσερολίμη και σε αυτή που έλαβε συνδυασμό αποδίδεται στην αυξημένη συχνότητα σοβαρών παρενεργειών από τον συνδυασμό. Επιπρόσθετα, η τεμσερολίμη παρουσίασε μικρότερη τοξικότητα από την ιντερφερόνη Α, παρατήρηση που συνηγορεί υπέρ της χορήγησης της τεμσερολίμης σε ασθενείς με καρκίνο του νεφρού <sup>149</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην έγκριση της χορήγησης της στη θεραπεία του διαυγοκυτταρικού καρκίνου του νεφρού ως μονοθεραπεία.

### 6.3.2 Νεφρικοί όγκοι σχετιζόμενοι με οζώδη σκλήρυνση

Η οζώδης σκλήρυνση είναι ένα σύνδρομο που οφείλεται στη μετάλλαξη είτε του γονιδίου Tsc1, είτε του γονιδίου Tsc2 στα κύτταρα των θηλαστικών, κληρονομείται με επικρατές αυτοσωμικό χαρακτήρα και εκδηλώνεται με την ανάπτυξη καλοήθων και ενίοτε κακοήθων όγκων σε διάφορα όργανα, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα, το δέρμα, τους πνεύμονες, την καρδιά και τα νεφρά. Η μετάλλαξη οδηγεί σε απορρύθμιση των γονιδίων αυτών και συνοδό ενεργοποίηση του mTORC1. Η διέγερση του αυξητικού γονιδίου Tsc1 και η συνοδός παραγωγή αμαρτίνης έχει αρνητική επίδραση στην παραγωγή της τουμπερίνης, η οποία παράγεται από το γονίδιο Tsc2. Η τουμπερίνη βοηθά την GTP υδρόλυση της Rheb, μια G-πρωτεΐνης, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει την ενέργεια του TOR. Η απουσία αυτής της αλληλουχίας οδηγεί σε αύξηση των κυττάρων και ενεργοποίηση του TORC1 <sup>74,150</sup>.

Στον ποντικό Ecker, που είναι ένα ζωικό μοντέλο οζώδους σκλήρυνσης το οποίο φέρει μεταλλαγμένο το γονίδιο Tsc2, η ραπαμυκίνη μειώνει την αύξηση των όγκων του νεφρού, γεγονός που σχετίστηκε με τη μείωση του p70S6k χωρίς επίδραση στην αύξηση του cyclin D1 ή τη μείωση του p27kip1 <sup>151</sup>. Στους ανθρώπους, το

αγγειομυολίπωμα που σχετίζεται με την οζώδη σκλήρυνση εμφανίζει αύξηση της έκφρασης της φωσφορυλιωμένης p70S6k1 και S6 πρωτεΐνης <sup>152</sup>. Επίσης σε μια μελέτη που δημοσιεύτηκε στο Lancet το 2013 από 11 χώρες στην οποία συμμετείχαν 118 ενήλικες ασθενείς με 1 τουλάχιστον αγγειομυολίπωμα >3εκ ή βεβαιωμένη οζώδη σκλήρυνση, συγκρίθηκε η χορήγηση 10mg την ημέρα εβερολίμης έναντι εικονικού φαρμάκου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς που έλαβαν το εβερολίμη μείωσαν το μέγεθος του όγκου τους κατά 42% έναντι 0% αυτών που έλαβαν το εικονικό φάρμακο. Ως σοβαρότερες παρενέργειες αναφέρθηκαν η στοματίτιδα στο 50% των ασθενών και η ακμή στο 22% <sup>152</sup>.

## **6.4 Επίδραση της ραπαμυκίνης στην οξεία νεφρική βλάβη (ONB)**

### **6.4.1 Ζωικά πρότυπα**

Σε συμφωνία με την αντι-πολλαπλασιαστική δράση της ραπαμυκίνης στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ραπαμυκίνη αναστέλλει την αναγέννηση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων στην ισχαιμικού τύπου οξεία νεφρική βλάβη. Παρόλα αυτά, η επίδρασή της στη νεφρική ισχαιμία φαίνεται να ποικίλει και να εξαρτάται από το από τη χρονική απόσταση, η οποία χωρίζει την οξεία νεφρική βλάβη και την έναρξη χορήγησης της ραπαμυκίνης, τη δόση και την οδό χορήγησης της. Σε πρώιμη χορήγηση, δηλαδή από την 0 έως την έβδομη ημέρα, η ραπαμυκίνη καθυστερεί την αποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας σε ποντικούς, καταστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό, την αναγέννηση και την επιβίωση των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων <sup>153</sup>. Παρά την αρχική επιδείνωση, τελικά παρατηρείται βελτίωση της νεφρικής λειτουργίας, ακόμα και μετά τη συνέχιση της χορήγησης ραπαμυκίνης <sup>115</sup>. Στις μελέτες που παρατηρήθηκε επιδείνωση της νεφρικής βλάβης, η ραπαμυκίνη χορηγήθηκε πριν την έναρξη της νεφρικής ισχαιμίας και συνεχίστηκε για επτά ημέρες σε δόσεις ικανές να προκαλέσουν ανοσοκαταστολή (0.2 mg/kg/ημέρα με ενδοπεριτοναϊκή ένεση) <sup>115,153</sup>.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε ένα μοντέλο νεφρικής ανεπάρκειας αλλογενούς μεταμόσχευσης. Οι Goncalves και συν (2006) παρατήρησαν ότι η απορρύθμιση του κυτταροπροστατευτικού γονιδίου εμπόδισε τη βραχυπρόθεσμη νεφροτοξικότητα που προκαλούσε η ραπαμυκίνη σε αυτό το μοντέλο <sup>155</sup>. Η

ραπαμυκίνη καταστέλλει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων στους νεφρούς των ποντικών 24 ώρες μετά την πρόκληση της νεφρικής ισχαιμίας<sup>155</sup>. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες έρευνες, ο Inman και συν (2003) παρατήρησε ότι η χορήγηση ραπαμυκίνης (0.2 mg/kg από του στόματος) δεν μετέβαλε τη νεφρική λειτουργία των ποντικών επτά ημέρες μετά. Η διαφορά στα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών θα μπορούσε να εξηγηθεί από το διαφορετικό δοσολογικό σχήμα και την διαφορετική οδό χορήγησης<sup>157</sup>.

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι μετά την αποκατάσταση της πρώιμης νεφροτοξικότητας, οι μακροχρόνιες επιδράσεις στον νεφρικό ιστό μπορεί να είναι προστατευτικές. Για παράδειγμα, η συνέχιση της χορήγησης της ραπαμυκίνης 16 εβδομάδες μετά από πρόκληση οξείας ισχαιμίας σε ποντικούς, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της πρωτεϊνουρίας, την μείωση της παραγωγής TGFβ1 στο νεφρικό φλοιό καθώς και τη μείωση των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP1, 2 και 3 και της κασπάσης-3<sup>158</sup>. Αντίθετα, σε μοντέλο υπερτασικών ποντικών με υπερπαραγωγή ρενίνης δεν παρατηρήθηκε η προστατευτική δράση της ραπαμυκίνης. Παρά την θεραπεία με ραπαμυκίνη η αρτηριακή πίεση των ποντικών παρέμεινε υψηλή και η προστατευτική δράση της ραπαμυκίνης στην ισχαιμικού τύπου οξεία νεφρική βλάβη δεν επιβεβαιώθηκε. Επιπλέον η ραπαμυκίνη προκάλεσε επιδείνωση της πρωτεϊνουρίας σε υπερτασικά ποντίκια<sup>159</sup>.

#### 6.4.2 Μελέτες σε ανθρώπους

Τα αποτελέσματα της ραπαμυκίνης στη οξεία νεφρική βλάβη δεν έχουν αξιολογηθεί επαρκώς. Η καθυστερημένη λειτουργία του μοσχεύματος που εμφανίζεται σε ασθενείς που έχουν μεταμοσχευθεί, παρουσιάζει ομοιότητες με την οξεία σωληναριακή νέκρωση. Στους μεταμοσχευμένους ασθενείς, η ραπαμυκίνη μπορεί παρατείνει την καθυστέρηση της λειτουργίας του μοσχεύματος, χωρίς όμως αυτό να επιβεβαιώνεται από το σύνολο των μελετών<sup>112</sup>. Ασθενείς με καθυστερημένη λειτουργία του μοσχεύματος στους οποίους χορηγήθηκε ραπαμυκίνη εμφάνισαν μείωση της νεφρικής έκφρασης της φωσφορυλιωμένης p70S6k, αλλά όχι της Akt ή NIK-NF-κB<sup>160</sup>.



Οι Smith και συν (2003) παρατήρησαν ότι οι ασθενείς που είχαν λάβει ραπαμυκίνη και στους οποίους καθυστέρησε η λειτουργία του νεφρικού μοσχεύματος εμφάνισαν μια μορφή νεφροπάθειας από κυλίνδρους, ανάλογη με εκείνη της νεφροπάθειας του μυελώματος, που οφείλεται σε απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των σωληναρίων και συνοδό απόφραξη του σωληναριακού αυλού <sup>160</sup>. Η πρωτεϊνουρία που παρατηρείται σε ασθενείς με καθυστερημένη λειτουργία του νεφρικού μοσχεύματος υπό ραπαμυκίνη αποδίδεται σε μείωση της σωληναριακής επαναρρόφησης πρωτεϊνών και όχι σε ποδοκυτταρική βλάβη <sup>161,162</sup>.

## **7. Η επίδραση της ραπαμυκίνης σε σπειραματοπάθειες**

Πολλές σπειραματικές παθήσεις οφείλονται σε αυτοάνοση βλάβη των σπειραματικών κυττάρων. Αν και οι αιτιολογικοί παράγοντες, από τους οποίους προκαλείται αυτή η αυτοάνοση διαταραχή δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, ο πολλαπλασιασμός των περιφερικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων θεωρείται απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση της ανοσολογικής απόκρισης<sup>157</sup>. Επιπλέον, ο πολλαπλασιασμός και υπερπλασία των ενδογενών σπειραματικών κυττάρων, όπως είναι τα μεσαγγειακά κύτταρα, στην περίπτωση της IgA νεφροπάθειας ή τα τοιχωματικά επιθηλιακά κύτταρα στην περίπτωση της μηνοειδούς σπειραματονεφρίτιδας μπορεί να επηρεάσει την νεφρική λειτουργία<sup>164</sup>. Οι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου έχουν ευρεία εφαρμογή στην θεραπεία των αυτοάνοσων νεφρικών παθήσεων και το ερώτημα που παραμένει αν και η ραπαμυκίνη είναι χρήσιμη στη θεραπεία τους<sup>165</sup>.

### **7.1 Ζωικά πρότυπα**

#### **7.1.1 Σπειραματοπάθειες που συνοδεύονται από νεφρωσικού επιπέδου πρωτεϊνουρία χωρίς υπερπλασία σπειραματικών κυττάρων**

Πολλές μελέτες έχουν εξετάσει κατά καιρούς την επίδραση της ραπαμυκίνης σε ζωικά μοντέλα σπειραματοπαθειών, που συνοδεύονται από βαριά πρωτεϊνουρία και ελάχιστη υπερπλασία σπειραματικών κυττάρων. Η επίδραση της ραπαμυκίνης έχει εξεταστεί στα πλαίσια μιας μελέτης<sup>166</sup>, σε παθητικά και ενεργητικά μοντέλα νεφρίτιδας Heymann. Στο μοντέλο παθητικής νεφρίτιδας του Heymann, η ραπαμυκίνη μείωσε την έκφραση των προ-φλεγμονωδών και προ-ινωτικών γονιδίων, τη διάμεση φλεγμονή και ίνωση, και την αντιρροπιστική νεφρική υπερτροφία<sup>167</sup>. Στο ενεργητικό μοντέλο, η ραπαμυκίνη έδειξε ότι ασκεί προφυλακτική επίδραση τόσο κατά τη διάρκεια της έναρξης, όσο και κατά τη χρόνια φάση<sup>167</sup>.

Σε μοντέλο αρουραίων με νεφροπάθεια που οφείλεται σε υπερφόρτωση με πρωτεΐνες, η χορήγηση ραπαμυκίνης ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων (μείωση της έκφρασης του τύπου D της κυκλίνης και αύξηση

του p27<sup>kip1</sup> αναστολέα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού) , δεν μετέβαλε την απόπτωσή τους, αλλά προκάλεσε οξεία νεφρική ανεπάρκεια, εξαιτίας εξεσημασμένου σχηματισμού σωληναριακών κυλίνδρων <sup>169</sup>. Με το φωτονικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκε αύξηση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνικών κυστιδίων στα σωληναριακά κύτταρα, αλλά η έκφραση του κυτταροσκελετικού δείκτη τουμπουλίνη δεν μειώθηκε καθώς και η επαναρρόφηση της σεσημασμένης λευκοματίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο σχηματισμός των κυλίνδρων δεν οφείλεται σε μείωση της ενδοκυττάρωσης της λευκοματίνης από τα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα. Στους φυσιολογικούς αρουραίους που χορηγήθηκε ραπαμυκίνη αυξήθηκε η χοληστερόλη ορού, δεν επηρεάστηκε η νεφρική λειτουργία, δεν προκλήθηκε πρωτεϊνουρία και νεφροπάθεια από κυλίνδρους <sup>170</sup>.

### 7.1.2 Μεσαγγειοϋπερπλαστική ΣΝΦ (μοντέλο Anti-thy1)

Το μοντέλο anti-thy1 σε αρουραίους χρησιμοποιείται για την κατανόηση του παθολογικού μηχανισμού της μεσαγγειοϋπερπλαστικής σπειραματονεφρίτιδας, που παρατηρείται στην IgA νεφροπάθεια και αποτελεί μια από τις πιο συχνές σπειραματικές νόσους στον κόσμο <sup>171</sup>. Τα αποτελέσματα της χορήγησης των αναστολέων του TORC1 είναι συγκρουόμενα στα ζωικά μοντέλα της μεσαγγειοϋπερπλαστικής σπειραματονεφρίτιδας. Τόσο η ραπαμυκίνη, όσο και η εβερολίμη είχαν βλαπτική επίδραση στα anti-thy1 μοντέλα, όταν χορηγούνταν στα αρχικά στάδια της νόσου και σε μεγάλες δόσεις <sup>171</sup>, αλλά παρουσίαζαν προστατευτική δράση, όταν χορηγούνταν μεταγενέστερα και σε μικρότερες δόσεις <sup>172</sup>.

Όταν η εβερολίμη χορηγήθηκε στα αρχικά στάδια και σε μεγάλη δόση (1-3 mg/kg) μείωσε τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την έκφραση της VEGF, ανέστειλε την επούλωση των τριχοειδών, οδήγησε στο σχηματισμό μικροανευρυσμάτων στα σπειραματικά τριχοειδή, μηννοειδών σχηματισμών προκάλεσε σπειραματοσκλήρυνση και επιδείνωσε τη νεφρική λειτουργία κατά τρόπο δόσοεξαρτώμενο <sup>171</sup>. Αντίθετα, όταν χορηγούνταν αργότερα ή σε χαμηλότερες δόσεις (0.3 mg/kg) μείωνε τη μεσαγγειακή αλλά όχι και την επιθηλιακή υπερπλασία και δεν ήταν επιβλαβής για την αρχιτεκτονική των σπειραμάτων <sup>171</sup>. Σε μια άλλη μελέτη με το μοντέλο anti-thy1, στην οποία χορηγήθηκε ραπαμυκίνη σε μικρή δόση

(2.5 mg/kg με το φαγητό) από την 10<sup>η</sup> ημέρα μέχρι την 20<sup>η</sup> εβδομάδα παρατηρήθηκε μείωση της πρωτεϊνουρίας, της αρτηριακής πίεσης, της φλεγμονής, της υπερπλασίας και βελτίωση της νεφρικής λειτουργίας<sup>172</sup>.

### **7.1.3 Πειραματική θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια**

Ο Keller και συν.1 (2006) εξέτασε, την επίδραση της αναστολής της υπερπλασίας των ενδοθηλιακών κυττάρων στην αποκατάσταση των αγγείων, σε ένα μοντέλο θρομβωτικής μικροαγγειοπάθειας. Το μοντέλο αυτό κατασκευάστηκε με τη χορήγηση αντισωμάτων μέσω της νεφρικής αρτηρίας ενάντια στα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η εβερολίμη ανέστειλε την έναρξη της υπερπλασίας των πειραματικών ενδοθηλιακών κυττάρων και δεν επηρέασε την αποκατάσταση των πειραματικών τριχοειδών<sup>174</sup>.

### **7.1.4. Πειραματικά πρότυπα νεφρίτιδας του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου (ΣΕΛ) σε επίμυες**

Η ραπαμυκίνη δρα προστατευτικά και σε μοντέλα της νεφρίτιδας του ΣΕΛ<sup>175</sup>. Συγκεκριμένα, μελέτες που έχουν γίνει σε θηλυκούς NZB/W F1 υβριδικούς επίμυες, οι οποίοι αναπτύσσουν αυτόματα μια αυτοάνοση ασθένεια, που προσομοιάζει με τον (ΣΕΛ) έδειξαν ότι η θεραπεία με ραπαμυκίνη (1 mg/kg, με χορήγηση από το στόμα) για χρονικό διάστημα από πέντε έως εννέα μήνες είχε παρόμοια αποτελέσματα με την κυκλοφωσφαμίδη. Η ραπαμυκίνη σε ιστολογικό επίπεδο περιόρισε την μεσαγγειακή και ενδοθηλιακή υπερπλασία του σπειράματος και υπέστρεψε τη σωληναριοδιάμεση φλεγμονή και ίνωση. Κλινικά παρατηρήθηκε ύφεση της πρωτεϊνουρίας και μείωση της θνησιμότητας<sup>175</sup>.

### **7.1.5 Μηνοειδής σπειραματονεφρίτιδα**

Το TORC1 είναι δυνατόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσοπαθογένεια, καθώς και στην τοπική πειραματική υπερπλασία που παρατηρείται στη μηνοειδή σπειραματονεφρίτιδα. Ποντίκια που εμφανίζουν υπερέκφραση του HIF1α ιδιαίτερα

στα ποδοκύτταρα, με Cre-lox απαλοιφή του γονιδίου VHL, παρουσιάζουν αυθόρμητα είτε μηνοειδή σπειραματονεφρίτιδα <sup>170</sup> είτε εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση <sup>177</sup>. Δυο μελέτες έχουν αξιολογήσει τα αποτελέσματα της δράσης της ραπαμυκίνης σε μοντέλα ποντικών, με μηνοειδή σπειραματοπάθεια η οποία προκλήθηκε με ενδοφλέβια χορήγηση νεφροτοξικού ορού,. Στα ποντίκια, η προφυλακτική χορήγηση ραπαμυκίνης πέντε ημέρες πριν την έναρξη της νόσου, μείωσε την υπερπλασία των φλεγμονωδών κυττάρων και τη παραγωγή αυτόλογων αντισωμάτων, αλλά δεν μετέβαλε την έκφραση των ρυθμιστικών CD4+CD25-FoxP3 κυττάρων στους λεμφαδένες. Αντίθετα όταν στο ίδιο μοντέλο anti-GBM σπειραματονεφρίτιδας η ραπαμυκίνη χορηγήθηκε 14 ημέρες μετά την έναρξη της νόσου, δεν παρατηρήθηκε μείωση της πρωτεϊνουρίας και τη φλεγμονής <sup>178</sup>. Η ευεργετική επίδραση της πρώιμης έναρξης της θεραπείας αποδόθηκε στην έγκαιρη καταστολή των T και B λεμφοκυττάρων. Όταν σε αυτό το μοντέλο χορηγήθηκε θεραπεία μετά από 14 μέρες κατεστάλησαν οι αναγεννητικοί μηχανισμοί μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα (καταστολή του αγγειακού αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου VEGF-A και των ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης των αιμοπεταλίων PECAM-1) και όχι στα ποδοκύτταρα (δεν μειώθηκαν τα επίπεδα των ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών) <sup>178</sup>.

### 7.1.6 Διαβητική νεφροπάθεια

Η ραπαμυκίνη παρέχει νεφροπροστασία ενάντια του σακχαρώδη διαβήτη σε μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια, τα οποία αποτελούν μοντέλα ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη, πιθανά λόγω των ανοσοτροποποιητικών της δράσεων. Η πρώιμη χορήγηση ραπαμυκίνης για περίπου 100 μέρες φάνηκε να προλαμβάνει την ανάπτυξη της νόσου. Ακολούθησε παρακολούθηση 41 εβδομάδων μετά τη διακοπή της ραπαμυκίνης χωρίς επανεμφάνιση της νόσου. Χορήγησή της μετά την εγκατάσταση του διαβήτη δεν είχε κανένα θεραπευτικό αποτέλεσμα <sup>180</sup>.

Σε μοντέλα ζώων που πάσχουν από διαβητική νεφροπάθεια, ο mTORC1 αυξάνεται μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την ενεργοποιημένη AMP κινάση (AMPK). Ειδικότερα τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης προκαλούν μείωση της φωσφορυλίωσης της AMPK και ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Akt/mTORC1. Η χορήγηση ραπαμυκίνης καταστέλλει τον mTOR περιορίζει την

σπειραματική υπερτροφία, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει αντιφλεγμονώδη και αντινωτική δράση<sup>181,182</sup>.

Επίσης μια άλλη μελέτη των Lloberas N και συν το 2007 σε μοντέλο επαγομένου με στρεπτοζοκίνη σακχαρώδη διαβήτη ποντικών, η χορήγηση ραπαμυκίνης από την 16<sup>η</sup> έως την 20<sup>η</sup> εβδομάδα μείωσε την λευκωματουρία, την έκφραση του TORC1, την φωσφορυλίωση της Akt, τον αυξητικό παράγοντα (TGF-β1, CTGF), την μεσαγγειακή υπερτροφία και την και την έκφραση του αSMA σε σχέση με τους μάρτυρες<sup>181</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε άλλα μοντέλα διαβήτη στα ποντίκια db/db<sup>180</sup> και σε ζώα που ελάμβαναν ινσουλίνη<sup>181</sup>. Τέλος σε παχύσαρκους διαβητικούς αρουραίους Zucker η νεφρική έκφραση των κινασών η ολική Akt, η ολική mTOR, η Ser473pAkt και η Ser2448pTOR ήταν αυξημένες, υποδηλώνοντας την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Akt/mTORC1. Η έκφραση των ανωτέρω μορίων αποκαταστάθηκε με τη χορήγηση ραπαμυκίνης<sup>183</sup>.

#### **7.1.7. Μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια**

Στην μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια οι μελέτες που διερευνούν την επίδραση της ραπαμυκίνης σε αυτή είναι ελάχιστες. Ο Boneggio και συν (2005) εξέτασαν την επίδραση της ραπαμυκίνης σε ένα μοντέλο σωληναριοδιάμεσης βλάβης με πρωτεϊνουρία. Σε αρουραίους χορηγήθηκε anti-Fx1A, για να αναπτυχθεί πειραματική μεμβρανώδης νεφροπάθεια του Heymann, ενώ στους αρουραίους αναφοράς χορηγήθηκε ορός υγιούς προβάτου. Μετά από τέσσερις εβδομάδες, οι αρουραίοι χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα αφαιρέθηκε ο αριστερός νεφρός, στη δεύτερη ομάδα αφαιρέθηκε ο αριστερός και ο άνω πόλος του δεξιού με παραμονή του 60% του δεξιού νεφρού και στην τρίτη ομάδα δεν έγινε καμία παρέμβαση. Η νεφρική λειτουργία και η ιστολογία με φωτονικό μικροσκόπιο, ανοσοφθορισμό και ανοσοϊστοχημεία αξιολογήθηκε μετά από άλλες τέσσερις εβδομάδες. Οι αρουραίοι που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου δεν ανέπτυξαν πρωτεϊνουρία, σε αντίθεση με αυτούς που δέχτηκαν το anti-Fx1A που εμφάνισαν σοβαρή πρωτεϊνουρία. Τα πρωτεϊνουρικά ζώα παρουσίασαν σωληναριοδιάμεση βλάβη η οποία ήταν εντονότερη σε αυτά με το 60% του δεξιού νεφρού. Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης μειώθηκε εξαιτίας της μείωσης της νεφρικής μάζας και μειώθηκε ακόμα περισσότερο στους αρουραίους με την δεξιά πολεκτομή<sup>167</sup>.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης αξιολογήθηκε η επίδραση της ραπαμυκίνης στην έκφραση των προφλεγμονωδών και ινωτικών γονιδίων, καθώς και η εξέλιξη της πρωτεϊνουρίας και της νεφρικής βλάβης. Επτά μέρες μετά, οι αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε anti-Fx1A και υποβλήθηκαν σε νεφρεκτομή, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, η μία λάμβανε ραπαμυκίνη (0.5mg/kg την ημέρα) και η άλλη όχι. Η αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων και της ιστολογίας του νεφρού πραγματοποιήθηκε την τέταρτη, όγδοη και δωδέκατη εβδομάδα. Η ραπαμυκίνη μείωσε την έκφραση των γονιδίων που προκαλούν φλεγμονή και έχουν ινωτική δράση. Σωληναριοδιάμεση φλεγμονή και εξέλιξη της διάμεσης ίνωσης παρουσιάστηκε στους αρουραίους που δεν έλαβαν ραπαμυκίνη, ενώ μειώθηκε σε αυτούς που την έλαβαν. Συνεπώς η ραπαμυκίνη σε μειωμένη δόση, για να αποφευχθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες που έχει στην αιμοποίηση και την νεφρική λειτουργία, μειώνει την σωληναριοδιάμεση βλάβη που οφείλεται σε χρόνια πρωτεϊνουρία και απώλεια της νεφρικής μάζας<sup>167</sup>.

## 7.2 Μελέτες σε ανθρώπους

Η επίδραση της ραπαμυκίνης στις σπειραματοπάθειες δεν είναι σαφής, εξαιτίας των μελετών που την συνδέουν με την εμφάνιση της οξείας νεφροτοξικότητας. Η πρώτη δημοσιευμένη μελέτη των Fervenza και συν (2004), αξιολόγησε την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της ραπαμυκίνης σε μια ομάδα 11 ασθενών με χρόνια πρωτεϊνουρική σπειραματική νόσο (εκ των οποίων 3 με μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια, 5 με IgA νεφρίτιδα, 3 με εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση και 1 με μεμβρανοϋπερπλαστική). Οι ασθενείς αυτοί απέβαλλαν περισσότερο από ένα γραμμάριο την ημέρα πρωτεΐνη και εκτιμήθηκε ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης. Στη μελέτη οι έξι από τους 11 συμμετέχοντες που έλαβαν ραπαμυκίνη ανέπτυξαν οξεία νεφρική βλάβη. Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης αποκαταστάθηκε μετά την διακοπή του φαρμάκου σε τέσσερις από τους έξι ασθενείς. Από τους άλλους δύο ο ένας υποβάλλεται πλέον σε εξωνεφρική κάθαρση και στον άλλο έγινε προσπάθεια επαναχορήγησης ραπαμυκίνης σε μικρότερη δόση μετά την αποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας αλλά και πάλι επιδείνωσε τη νεφρική του λειτουργία. Η μελέτη αυτή δεν παρέχει περισσότερα στοιχεία για τους 3 ασθενείς με ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια. Άλλωστε στόχος της μελέτης

ήταν να εκτιμηθεί η ασφάλεια του φαρμάκου σε πρωτεϊνουρικά νοσήματα και η συσχέτιση με συγκεκριμένη πάθηση<sup>184</sup>.

Ο ρόλος της ραπαμυκίνης σε ασθενείς με εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση παραμένει επίσης αδιευκρίνιστος αφού οι υπάρχουσες μελέτες μοιράζονται την ευεργετική επίδραση και τη νεφροτοξικότητα<sup>185,186</sup>. Η ραπαμυκίνη προκάλεσε πλήρη ύφεση της πρωτεϊνουρίας (<300 mg/24ωρο στους 6 μήνες) σε τέσσερις ασθενείς και μερική ύφεση (50% μείωση της αρχικής πρωτεϊνουρίας) σε άλλους οκτώ από τους 21 ασθενείς σε μελέτη των Tumlin και συν. η οποία διήρκησε έξι μήνες. Οι δώδεκα συνολικά ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία μαζί με άλλους που δυο εμφάνισαν μείωση της πρωτεϊνουρίας κατά 30% συνέχισαν την θεραπεία με ραπαμυκίνη για άλλους έξι μήνες (σύνολο 12 μήνες). Σε αυτούς τους ασθενείς ενώ η πρωτεϊνουρία τους πρώτους έξι μήνες μειώθηκε σημαντικά στους επόμενους έξι μήνες η μείωση της δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συμπερασματικά η ραπαμυκίνη φαίνεται να σταθεροποιεί τη νεφρική λειτουργία των ασθενών με εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση και να μειώνει την πρωτεϊνουρία<sup>185</sup>.

Αντίθετα, άλλες μελέτες δείχνουν ότι η ραπαμυκίνη πιθανόν να παρουσιάζει νεφροτοξική δράση σε ασθενείς με εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση<sup>145,146</sup>. Κοινό συμπέρασμα των μελετών αυτών καθώς και των μελετών με ασθενείς με χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος είναι ότι όσο μεγαλύτερη είναι η χρονική διάρκεια της νόσου τόσο πιθανότερη είναι η εμφάνιση νεφροτοξικότητας και αποτυχίας της θεραπείας. Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί δυο περιπτώσεις ασθενών με χρόνια υποτροπιάζον νεφρωσικό σύνδρομο στα πλαίσια της νόσου των ελαχίστων αλλοιώσεων που ανταποκρίθηκαν θεαματικά σε συνδυασμό ραπαμυκίνης με τακρολίμη<sup>187</sup> ή κυκλοσπορίνη<sup>188</sup> τουλάχιστον 15 χρόνια μετά την εμφάνιση της νόσου. Στην περίπτωση της μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας, δεν υπάρχουν ακόμα δεδομένα από ολοκληρωμένες μελέτες σε ανθρώπους, αλλά είναι σε εξέλιξη μια κλινική μελέτη χρηματοδοτούμενη από το NIH.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια αναδρομική μελέτη με 62 ασθενείς με μεταμόσχευση νησιδιακών κυττάρων του παγκρέατος. Τρεις από τους 62 ασθενείς ανέπτυξαν πρωτεϊνουρία και πέντε ολιγο-λευκωματινουρία κατά την αλλαγή της θεραπείας από αναστολέα καλσινευρίνης σε ραπαμυκίνη. Οι δύο από τους τρεις ασθενείς είχαν επιβεβαιωμένη διαβητική νεφροπάθεια και δεν ωφελήθηκαν από την αλλαγή. Η



πρωτεϊνουρία βελτιώθηκε μετά την αύξηση της δόσης του αναστολέα της καλσινευρίνης και αντικατάσταση της ραπαμυκίνης με μυκοφαινολικό, γεγονός που υποδηλώνει ότι όπως και στους ασθενείς με χρόνια νεφροπάθεια του μοσχεύματος η πρωτεϊνουρία οφείλεται εν μέρει στην απόσυρση του αναστολέα της καλσινευρίνης <sup>189</sup>.

### **7.3 Συστηματικές επιδράσεις της ραπαμυκίνης με πιθανή επίδραση στη νεφρική λειτουργία**

Οι κυριότερες συστηματικές επιδράσεις της ραπαμυκίνης που συμβάλλουν στην εξέλιξη της νεφρική βλάβη είναι η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, η υπεργλυκαιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη. Σε ότι αφορά την υπέρταση, σε μεταμοσχευμένους ασθενείς έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση ραπαμυκίνης συνοδεύεται από αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μείωση της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειακής χάλασης και τη μειωμένη παραγωγή νιτρικού οξειδίου φαινόμενο που έχει επίσης παρατηρηθεί σε αρουραίους <sup>190</sup>.

Όσον αφορά την υπερλιπιδαιμία, είναι γνωστό ότι η ραπαμυκίνη παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση με την πρόκληση υπερλιπιδαιμίας. Οι πιθανές συνέπειες της αύξησης των λιπιδίων στον ορό, στη συγκεκριμένη περίπτωση, είναι άγνωστες. Η κατάσταση περιπλέκεται από το γεγονός ότι η ραπαμυκίνη, παρά την αύξηση των λιπιδίων, έχει αντι-αθηρωσκληρυντική δράση σε knockout για την απολιποπρωτεΐνη E ποντίκια, εξαιτίας της αντιπολλαπλασιαστικής της δράσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα <sup>191</sup>.

Όλο και περισσότερα δεδομένα καταδεικνύουν ότι η ραπαμυκίνη προκαλεί επιδείνωση της υπεργλυκαιμίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη. Η φυσιολογική μετάδοση του σήματος της ινσουλίνης εξαρτάται από την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K-Akt-mTORC1 μέσω του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS). Μακροχρόνια χορήγηση ραπαμυκίνης σχετίζεται με μειωμένη ενεργοποίηση των IRS-1, IRS-2 και Akt σε μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος μεταμοσχευμένων μετά από φόρτιση με ινσουλίνη <sup>192</sup>. Τα παραπάνω ευρήματα είναι σε συμφωνία με την αναδρομική ανάλυση των δεδομένων του αρχείου των ΗΠΑ (United States Renal Data System) 20.124 ασθενών, τα οποία έδειξαν μια μικρή αύξηση του κινδύνου για πρωτο-εμφανιζόμενο διαβήτη στους ασθενείς που

ελάμβαναν ραπαμυκίνη και ειδικά σε συνδυασμό με έναν αναστολέα της καλσινευρίνης<sup>193</sup>. Ο μηχανισμός της αυξημένης επίπτωσης ίσως είναι πολυπαραγοντικός και να οφείλεται εκτός από τη μειωμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-Akt-mTORC1 σε διάφορα κύτταρα και σε άμεσες επιδράσεις στα β-κύτταρα, καθώς και σε μειωμένη κυτταρική έκφραση των μεταφορέων γλυκόζης GLUT1-4.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Σκοπός της μελέτης

Η μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια είναι μια συχνή αιτία νεφρωσικού συνδρόμου, ιδιαίτερα σε καυκάσιους, όπου αφορά το 20% των περιπτώσεων<sup>30</sup>. Πλήρης ή μερική ύφεση χωρίς αγωγή παρατηρείται στο 5-32% στο πρώτο έτος από την έναρξη της νόσου και στο 30% των περιπτώσεων στη 5ετία, σε ασθενείς με πρωτεϊνουρία μεγαλύτερη των 8gr/24ωρο<sup>194-196</sup>. Από το υπόλοιπο 65%, ένα 25% καταλήγει σε εξωνεφρική κάθαρση στην 5ετία, ένα 35% στη 10ετία και ένα 40% στην 15ετία. Το 40% των περιπτώσεων που δεν μπαίνει σε ύφεση και δεν καταλήγει σε αιμοκάθαρση έχει χρόνια νεφρική βλάβη με κυμαινόμενη πρωτεϊνουρία και χρήζει τακτικής ιατρικής παρακολούθησης<sup>56,194,195,197</sup>. Με βάση λοιπόν αυτά τα αποτελέσματα έχουν προταθεί ποικίλες θεραπείες για το 70% των ασθενών που δεν εισέρχονται σε ύφεση και παρουσιάζουν μεγάλη πιθανότητα να καταλήξουν σε τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια<sup>194,198,199</sup>.

Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι η πλειοψηφία των περιπτώσεων έχει κυκλοφορούντα αντισώματα είτε έναντι του υποδοχέα της φωσφολιπάσης A2 των ποδοκυττάρων, είτε έναντι της θρομβοσποντίνης 1 7A και οι οποίοι έχει αντίστοιχο ρόλο με την μεγκαλίνη των αρουραίων στο πειραματικό μοντέλο της μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας<sup>34</sup>. Επίσης, έχει περιγραφεί ότι οι ουδέτερες ενδοπεπτιδάσες των ποδοκυττάρων σε νεογέννητα μωρά αποτελούν αντιγονικό επίτοπο στην αλλοάνοσο βρεφική μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια<sup>200</sup>, η θετικά φορτισμένη βόεια πρωτεΐνη του ορού στην παιδική ηλικία<sup>201</sup>, καθώς και κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα έναντι ανθρώπινων αντιγόνων<sup>202</sup>. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ενδοκυτταρική βλάβη η προκαλούμενη από τη δράση του συμπληρώματος, η οποία προκαλεί την παρουσίαση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και κρυφών επιτόπων, ενεργοποιώντας ένα δεύτερο κύμα ανοσολογικής απάντησης<sup>203,204</sup>.

Το μοντέλο της Heymann νεφρίτιδας αποτελεί ένα πιστό μοντέλο αναπαραγωγής σε πειραματικό επίπεδο της μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας<sup>205</sup>. Στο ενεργητικό μοντέλο η ανοσοποίηση των Lewis αρουραίων γίνεται με εκχύλισμα επιθηλιακών

πρωτεϊνών των ποδοκυττάρων (Fx1A). Στο παθητικό μοντέλο χορηγείται ενδοφλεβίως ο ετερόλογος αντιορός έναντι των επιθηλιακών κυττάρων (antiFx1A), ο οποίος εντός ωρών προκαλεί την εναπόθεση ετερόζυγων IgG υποεπιθηλιακών εναποθέσεων. Μετά από 5 μέρες, εμφανίζεται πρωτεϊνουρία στο 100% των αρουραίων. Η ετερόλογη φάση ενεργοποίησης ακολουθείται μετά 15 μέρες από μια αυτόλογη φάση, όπου IgG αντισώματα παράγονται έναντι των ετερόλογων IgG. Τα αυτόλογα IgG αλλοαντισώματα, εναποτίθενται και αυτά υποεπιθηλιακά, επιδεινώνοντας την πρωτεϊνουρία μιμούμενα την ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια. Σε αυτή την περίοδο παράγονται αυτοαντισώματα έναντι ενός εξωγενούς αντιγόνου, καθώς και νέα αντιγόνα που εναποτίθενται υποεπιθηλιακά, κατά τη διάρκεια της αρχικής βλάβης <sup>206</sup>. Συνεπώς, η αυτόλογη (2η) φάση της παθητικής Heymann σπειραματοπάθειας είναι αυτή που μιμείται τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που περιγράφονται στη σύγχρονη βιβλιογραφία για την ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια.

Μέχρι προ 5ετίας δεν είχαν αλλάξει πολλά πράγματα από την κλασσική θεραπεία του Ponticelli για 6 μήνες με την μηνιαία εναλλαγή χορήγησης κορτιζόνης και κυκλοφωσφαμίδης, σε περιπτώσεις ανθεκτικής πρωτεϊνουρίας (>8gr/24ωρο). Την τελευταία 5ετία η είσοδος της ριτουξιμάμπης στη θεραπευτική φαρέτρα έδωσε μεγαλύτερη έμφαση στο ρόλο των B λεμφοκυττάρων και των IgG ανοσοσφαιρινών που παράγουν. Η ανοσοκατασταλτική δράση της ραπαμυκίνης αποδίδεται στην αναστολή των πολλαπλασιαστικών κυτταροκινών και της παραγωγής κλώνων T λεμφοκυττάρων <sup>207</sup>. Πρόσφατα περιγράφηκε ο ρόλος της ραπαμυκίνης στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των B λεμφοκυττάρων <sup>208</sup> και στον περιορισμό της ικανότητας τους να παράγουν ανοσοσφαιρίνες <sup>209</sup>.

Ο Boneggio και οι συνεργάτες το 2005 έδειξαν ότι μικρή δόση ραπαμυκίνης υποστρέφει την πρωτεϊνουρία σε πειραματικό μοντέλο μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας, μειώνει τη διαμεσοσωληναριακή ίνωση και φλεγμονή μέσω μείωσης της έκφρασης προφλεγμονωδών και προϊνωτικών παραγόντων <sup>210</sup>. Η ευεργετική επίδραση της ραπαμυκίνης έχει αναδεχθεί και σε μοντέλο ενεργητικής νεφρίτιδας του Heymann <sup>168</sup>. Σκοπός και της παρούσης μελέτης είναι να εξεταστεί η επίδραση της ραπαμυκίνης στην πρωτεϊνουρία και στην ιστοπαθολογική βλάβη σε πειραματικό μοντέλο μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας. Η καινοτομία αυτής της μελέτης έγκειται στη μελέτη της επίδρασης της ραπαμυκίνης στην έκφραση των

ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών του διαφράγματος της σχισμής διήθησης νεφρίνη και ποδοσίνη.

## **2. Υλικά και μέθοδοι**

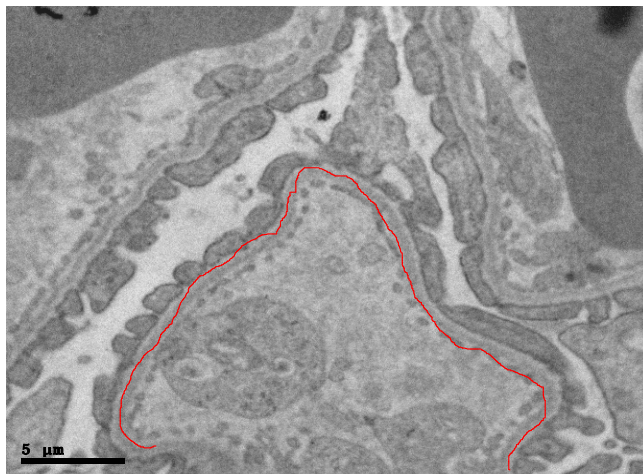
Χρησιμοποιήθηκαν 18 αρσενικοί αρουραίοι Sprague Dawley (Ινστιτούτο Παστέρ Αθήνα), ηλικίας 6-8 εβδομάδων και βάρους 150gr. Η μελέτη ήταν σύμφωνη με τις διατάξεις της κείμενης Ευρωπαϊκής νομοθεσίας για τα ερευνητικά πρωτόκολλα σε ζώα, καθώς και των κανόνων βιοηθικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τα ζώα διέμεναν στο χώρο του εργαστηρίου Νεφρολογίας με θερμοκρασία μεταξύ 18-24 βαθμούς κελσίου, 12ωρο φωτισμό και 12ωρο σκοτάδι και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε φαγητό με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη 20% και σε νερό. Για την επίτευξη του μοντέλου της παθητικής μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας του Heymann χορηγήθηκε εφάπαξ ενδοφλέβια antiFx1 από πρόβατο σε 12 αρουραίους σε δόση 0,5ml/100gr βάρους σώματος. Ο αντιορός antiFx1 ήταν μια ευγενική δωρεά του A Kerjaschki από το Πανεπιστήμιο της Βιέννης (Αυστρία). Πριν την ενδοφλέβια χορήγηση του antiFx1, οι αρουραίοι αναισθητοποιήθηκαν με κεταμίνη 67mg/kg και ξυλαζίνη 10mg/kg βάση της διεθνούς βιβλιογραφίας. Όλα τα ζώα ξύπνησαν χωρίς πρόβλημα.

Μια εβδομάδα μετά την ενδοφλέβια έγχυση και οι 12 αρουραίοι παρουσίασαν πρωτεϊνουρία. Οι υπόλοιποι 6 αρουραίοι που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (HC) έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά τον διαλύτη της ραπαμυκίνης (DMSO). Σε 6 από τους 12 πρωτεϊνουρικούς αρουραίους, μετά από τυχαία επιλογή, χορηγείτο καθημερινά υποδόρια ραπαμυκίνη σε δόση 0.5mg/kg (PHN-Rapa group). Στους υπόλοιπους 6 πρωτεϊνουρικούς (PHN group) χορηγείτο ενδοπεριτοναϊκά διαλύτη της ραπαμυκίνης (DMSO), ίδιο με αυτό των υγιών μαρτύρων. Η προμήθεια της ραπαμυκίνης έγινε από τη SIGMA, St Louis, MO, USA. Στη συνέχεια ακολούθησε εβδομαδιαία παρακολούθηση της πρωτεϊνουρίας, του σωματικού βάρους και αντίστοιχη προσαρμογή της δόσης της ραπαμυκίνης. Η μέτρηση της πρωτεϊνουρίας έγινε με φασματοφωτόμετρο με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) σε δείγμα ούρων όγκου 1μL μετά από συλλογή ούρων 24ώρου. Η μετρούμενη οπτική πυκνότητα (OD) σε μήκος κύματος 590 μετατρέπεται σε συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης (ΟΠ σε μg/ml), μετά από αναγωγή σε πρότυπη καμπύλη, βασισμένη σε

γνωστές συγκεντρώσεις βόειου λευκωματίνης (BSA) με βάση την εξίσωση  $OP=(OD-0,0232)/0,0558$ . Η μετρούμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης πολλαπλασιαζόταν με τον συνολικό όγκο των ούρων 24ώρου(σε  $\mu\text{L}$ ) και παρείχε τη συνολική πρωτεϊνουρία σε  $\mu\text{g}/\text{ημέρα}$ . Η συλλογή ούρων 24ώρου γινόταν σε μεταβολικά κλουβιά (Tecniplast, Italy). Όλα τα ζώα θυσιάστηκαν 7 εβδομάδες μετά τη χορήγηση της ραπαμυκίνης. Η θυσία του ζώου γινόταν μετά από αναισθητοποίηση τους με κεταμίνη και ξυλαζίνη. Κατά τη θυσία, γινόταν λήψη αίματος με παρακέντηση της καρδιάς για μέτρηση της κρεατινίνης και των επιπέδων ραπαμυκίνης. Τα επίπεδα ραπαμυκίνης μετρήθηκαν με ELISA σε ολικό αίμα σε αναλυτή Imx Analyzer, Abbott, USA και η κρεατινίνη με μέτρηση ρουτίνας σε αυτόματο αναλυτή Olympus, Tokyo, Japan. Ακολουθούσε η αφαίρεση και το ζύγισμα των οργάνων (ήπαρ, σπλήνας, νεφρά, καρδιά). Τα όργανα τοποθετούνταν άμεσα σε 2 τριβλία Petri με 5 ml PBS 1x σε πάγο για ζύγισμα και περαιτέρω επεξεργασία. Μετά την αφαίρεση της κάψας, τα νεφρά τέμονταν κατά τον επιμήκη (μετωπιαίο) άξονα και στη συνέχεια γινόταν αφαίρεση της πυέλου και από τους δύο νεφρούς ενώ από το δεξιό γινόταν επιπρόσθετα αφαίρεση και της μυελώδους μοίρας.

Ο αριστερός νεφρός τεμαχιζόταν σε 6 συνολικά τεμάχια: 3 τμήματα χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες ανοσοφθορισμού, 1 τμήμα για τη μελέτη με φωτονικό μικροσκόπιο, 1 για ηλεκτρονική μικροσκοπία και 1 για μελέτη ανοσοεντόπισης με χρυσό. Τα τεμάχια που προορίζονται για τον ανοσοφθορισμό εμβαπτίζονταν σε σταγόνες OCT (Sakura Finetek USA) πάνω σε ταινίες προσροφητικού χαρτιού Watmann και καταψύχονταν ταχέως σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, τοποθετούνταν σε σωληνάρια Konig και αποθηκεύονταν στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη διενέργεια του ανοσοφθορισμού. Το τεμάχιο που προοριζόταν για φωτονικό μικροσκόπιο τοποθετούνταν σε ουδέτερη φορμόλη 10% και αποστέλλονταν σε νεφροπαθολογοανατόμο για έγκλειση σε παραφίνη και χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη και περιοδικό οξύ (PAS). Το τεμάχιο που προοριζόταν για ηλεκτρονική μικροσκοπία τοποθετούνταν σε διάλυμα γλουταραλδεΐδης 5% v/v σε 0.1M phosphate buffer και αποστέλλονταν στο εργαστήριο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για έγκληση. Η διαδικασία της έγκλησης περιλάμβανε την περαιτέρω μονιμοποίηση σε 1% τετροξείδιο του Οσμίου για 1 ώρα, αφυδάτωση του ιστού σε διαδοχικές αραιώσεις αιθανόλης και έγκληση σε ρητίνη Epon 812. Στη συνέχεια, με μικροτόμο κόβονταν πολύ λεπτές τομές (40-50nm), οι οποίες

τοποθετούνταν σε δίσκους πλέγματος χρυσού και βάφονταν με οξεικό ουρανύλιο και κιτρικό μόλυβδο. Η εξέταση των τομών γινόταν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο JEM 100 CX-II; JEOL, Tokyo Japan. Τουλάχιστον 20 σπειράματα εξετάστηκαν σε κάθε 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 μετρούνταν το πάχος της βασικής μεμβράνης (BM) όλων των ανοικτών τριχοειδικών αγκυλών των σπειραμάτων (loop length, LL), καθώς και ο ακριβής αριθμός των ποδικών εκβλαστήσεων (FPN) που επικάλυπταν τη βασική μεμβράνη των αγκυλών (Εικόνα 14). Το πάχος των ποδικών εκβλαστήσεων (FPW) σε κάθε τριχοειδή αγκύλη υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:  $FPW = (\pi/4 \times LL) / FPN$ , όπου το  $\pi/4$  διορθώνει την διακύμανση της γωνίας τομής σε σχέση με τον κάθετο άξονα των ποδίσκων. Η πυκνότητα των ποδικών εκβλαστήσεων μετρήθηκε με τον τύπο:  $FPD = FPN/LL$



**Εικόνα 14:** Μέτρηση του πάχους της ΒΜ σε τριχοειδή αγκύλη (κόκκινη γραμμή, loop length, LL) καθώς και του αριθμού των ποδικών εκβλαστήσεων (FPN) που επικάλυπτουν το μήκος αυτό. Το πάχος των ποδικών εκβλαστήσεων (FPW) υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$FPW = (\pi/4 \times LL) / FPN$$

Για τον ανοσοφθορισμό (ΑΦ), ο παγωμένος ιστός κοβόταν σε λεπτές τομές πάχους 5  $\mu\text{m}$  με κρυοτόμο (στους -20 βαθμούς Κελσίου) και οι τομές τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα για να ακολουθήσει μονιμοποίηση σε 4% παραφορμαλδεΐδη σε PBS 1X, pH=7.4 για 13 λεπτά. Ακολουθούσε επώαση με Triton X100 σε 0.1% PBS 1X, παρεμπόδιση μη ειδικής σύνδεσης (blocking) με BSA 5% και επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα καθόλη τη διάρκεια της νύχτας.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στον ανοσοφθορισμο ήταν έναντι της νεφρίνης του χοιριδίου Γουινέας σε αραιώση 1:250 (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany), έναντι της ποδοσίνης κουνελιού σε αραιώση 1:100, (Abcam, UK) και της ποντικού ακτίνη mAb (1:3000) (C4;Chemicon International, Temecula, CA).

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν τα αντίστοιχα δευτερογενή αντισώματα κατσίκας σε αραιώση 1/1000 έναντι κουνελιού ή χοιριδίου Γουινέας ή αρουραίου: Alexa Fluor 488 και 555, Molecular Probes, Invitrogen CA. Τέλος, οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλύπτονταν με το υλικό mowiol 4-88 (Calbiochem) και καλυπτρίδα. Τουλάχιστον 30 σπειράματα εξετάστηκαν ανά ζώο με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού Nikon εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα. Η ένταση του φθορισμού βαθμολογήθηκε σε μια κλίμακα από 0 έως 3+, όπου 0 = απουσία φθορισμού, 1+ = ήπιος, 2+ = μέτριος και 3+= ισχυρός φθορισμός.

Όσον αφορά τον δεξιό νεφρό μετά την αφαίρεση της κάψας, της πυέλου και της μυελώδους μοίρας, ακολούθησε απομόνωση των σπειραμάτων με 3 διαδοχικά κοσκινίσματα σε διαφορετικά κόσκινα (Retsch, Haan, Germany), τα οποία είχαν πόρους 150 $\mu$ m, 106 $\mu$ m και 75 $\mu$ m, αντίστοιχα και στη συνέχεια γινόταν συλλογή των σπειραμάτων από την κάτω επιφάνεια του τελευταίου κόσκινου, το οποίο είχε πόρους διαμέτρου 75 $\mu$ m. Η καθαρότητα του προϊόντος σε σπειράματα ξεπερνούσε το 95%. Ακολουθούσαν διαδοχικά ξεπλύματα με PBS και τα σπειράματα συγκεντρώνονταν ως ίζημα μετά από φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στις 1200 στροφές ανά λεπτό. Το ίζημα ομογενοποιούνταν με το RIPA buffer, μαζί με αναστολείς πρωτεασών και φυλασσόταν στους -80 °C.

Το RIPA-buffer περιείχε 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. Στο διάλυμα αυτό προστίθεντο οι αναστολείς πρωτεασών (ανά ml διαλύματος RIPA): 10 $\mu$ l PMSF 1mM, 5 $\mu$ l Orthovanadate 1mM, 2.5 $\mu$ l Leupeptin 25mg/ml, 5 $\mu$ l Aprotinin 5 mg/ml.

Για τις αναλύσεις με western blot 40mg περίπου νεφρικού ιστού ομογενοποιούνταν σε 1ml RIPA-buffer με αναστολείς πρωτεασών σε ειδικό γυάλινο γουδί. Ακολουθούσε διήθηση του ομογενοποιημένου ιστού από ηθμό για τη συγκράτηση ινωδών και μη ομογενοποιημένων ρακών, φυγοκέντρηση του διηθήματος στα



14000g, μέτρηση της συνολικής περιεχόμενης πρωτεΐνης και αποθήκευση κλασμάτων (aliquots) των 40μg από το υπερκείμενο στους -80 °C. Για κάθε western blot εξέταση δείγματα των 40μg ολικής πρωτεΐνης σε RIPA, βράζονταν για 5 λεπτά στους 100°C με 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) και στη συνέχεια γινόταν ηλεκτροφόρηση σε γέλη 7.5% SDS-polyacrylamide και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Germany).

Ακολουθούσε η διαδικασία παρεμπόδισης της μη ειδικής σύνδεσης (blocking) για 1 ώρα με γάλα 5% χαμηλό σε λιπαρά σε 0.05% Tween20-TBS και επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα νεφρίνης χοιριδίου Γουνέας pAb (1:500) (Progen Biotechnic GmbH, Germany), ποδοσίνης κουνελιού (1:500) (Abcam, Cambridge, UK), ακτίνης ποντικίου mAb (1:3000) (C4; Chemicon International, Temecula, CA), καθόλη τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C. Ακολούθως γινόταν ξέπλυμα των μεμβρανών 3 φορές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 0.05% Tween-20 σε TBS τόσο πριν όσο και μετά την εφαρμογή του κατάλληλου δευτερογενούς κεκαθαμένου αντισώματος συζευγμένου με περοξειδάση (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Οι μεμβράνες υποβάλλονταν σε αυτοραδιογραφία για διάστημα από 1/2 έως 5 λεπτά. Οι πρωτεϊνικές ζώνες μετρήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος πυκνομέτρησης ImageJ (διαθέσιμο στη διεύθυνση <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) και οι τιμές ομαλοποιήθηκαν βάση τις αντίστοιχες μετρήσεις για την ακτίνη. Η νεφρίνη ανιχνεύτηκε στα 170kd, η ποδοσίνη στα 42kd και η ακτίνη στα 44kd.

Για την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Quantitative RT-PCR) χρησιμοποιήθηκε ένα τριτημόριο του δεξιού νεφρού. Για την εξαγωγή ολικού RNA εφαρμόστηκε η μέθοδος Chomczynski δηλαδή έγινε διαχωρισμός του ολικού RNA σε υδατική φάση με θειοκυανικό γουανίδιο, φαινόλη και χλωροφόρμιο (Trizol Reagent, Life Technologies; Gibco BRL, Paisley, UK). Μετά το διαχωρισμό 1μg ολικού RNA, μεταγράφηκε ανάστροφα (SUPERScript II; Gibco) και πολλαπλασιάστηκε με PCR (RT-PCR). Τα προϊόντα της PCR ομαλοποιήθηκαν με βάση την έκφραση της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης (Gapdh). Όλες οι μετρήσεις έγιναν στη συσκευή για RT-PCR ABI Prism 7000 System (Applied Biosystems; Foster City, California, USA). Για τις

αντιδράσεις, χρησιμοποιήθηκε iTaq SYBR Green Supermix με ROX (Bio-Rad). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο 2- $\Delta\Delta C_t$  και όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται στον πίνακα 1.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος
Nphs1	Forward	5'- CTAAGGATGGGCTGCTTCTC -3'	bp
	Reverse	5'- TCACTGAGGTCACACAGGCTTC -3'	
Nphs2	Forward	5'- TGCCTGGACACCTATCACAAG-3'	bp
	Reverse	5'- TCCATGCGGTAGTAGCAGAC -3'	
Gapdh	Forward	5'- TGATTCTACCCACGGCAAGT-3'	bp
	Reverse	5'- AGCATCACCCCATTTGATGC-3'	

**Πίνακας 1.** Αλληλουχίες εκκινητών για τα γονίδια νεφρίνης (*Nphs1*), ποδοσίνης (*Nphs2*) και *GAPDH* που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-PCR

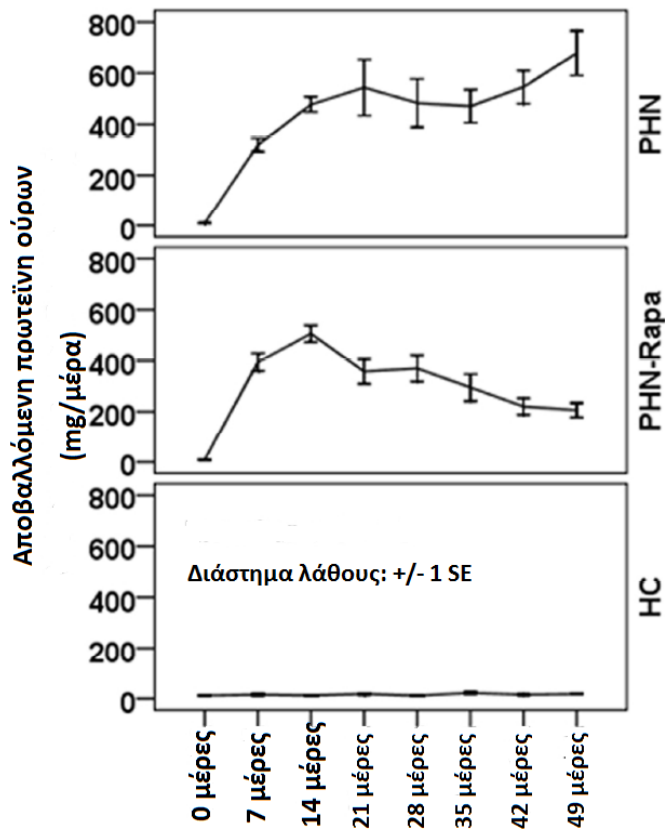
Τέλος, η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS/PC 17. Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD). Ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση μεταβλητών, όπως η τιμή κρεατινίνης ανάμεσα στις ομάδες μελέτης. Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έγιναν για να συγκριθούν δεδομένα, όπως η εβδομαδιαία πρωτεϊνουρία και το σωματικό βάρος. Η Kruskal – Wallis και η μέση τιμή χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των μη παραμετρικών δεδομένων. Η δοκιμασία μονού δείγματος Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ύπαρξης ή όχι κανονικής κατανομής στα δεδομένα. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για  $P < 0.05$  (διπλής ουράς).

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά

Η απέκκριση πρωτεΐνης 24ωρου, τόσο στην ομάδα των πασχόντων αρουραίων (PHN), όσο και στην ομάδα που της χορηγήθηκε ραπαμυκίνη (PHN-RAPA), αυξήθηκε σε επίπεδα νεφρωσικού επιπέδου την έβδομη μέρα και παρέμεινε στα ίδια επίπεδα μέχρι και την συμπλήρωση της 2<sup>ης</sup> εβδομάδας μετά τη χορήγηση του anti-Fx1. Στο τέλος των 14 ημερών μετά την χορήγηση του antiF<sub>x</sub>1, στη PHN-RAPA ομάδα η πρωτεϊνουρία σταδιακά άρχισε να υποχωρεί, ενώ στα πάσχοντα PHN αυξανόταν ανεξέλεγκτα. Τα φυσιολογικά ζώα (HC) τα οποία έλαβαν DMSO δεν παρουσίασαν καμιά μεταβολή στην πρωτεϊνουρία τους. Στο τέλος της μελέτης, στις 7 εβδομάδες μετά την χορήγηση του antiF<sub>x</sub>1 - η απέκκριση πρωτεΐνης στους PHN-RAPA ανερχόταν περίπου στο 1/3 των πασχόντων PHN αρουραίων ( $p=0,007$ , ανάλυση διακύμανσης ANOVA). Παρόλο που η πρωτεϊνουρία είχε σαφή βελτίωση και θεωρείται ως μερική ύφεση, ποτέ δεν έφτασε τα επίπεδα των HC αρουραίων, στο τέλος των 7 εβδομάδων της μελέτης (βλέπε εικόνα ).

Αν και όλες οι ομάδες μελέτης είχαν αντίστοιχη πρόσβαση σε τροφή και νερό, η PHN-RAPA ομάδα είχε το 66% και το 45% του σωματικού βάρους, σε σχέση με την PHN και την HC ομάδα, αντίστοιχα. Επίσης, ο λόγος του νεφρικού έναντι του ολικού βάρους σώματος στο τέλος της μελέτης ήταν μεγαλύτερος στην PHN (0,013) ομάδα έναντι των PHN-RAPA (0,01) και HC (0,009) ομάδων ( $p < 0,01$ ). Η κρεατινίνη ορού ήταν σαφώς υψηλότερη στα HC ζώα, λόγω και του μεγαλύτερου σωματικού βάρους. Τα ολικά λευκώματα και η λευκωματίνη ορού στα ζώα, που έλαβαν αγωγή ήταν υψηλότερα σε σχέση με τα μη θεραπευμένα PHN, παρόλα αυτά δεν έφτασαν στα επίπεδα των μαρτύρων HC αρουραίων. Τα επίπεδα της ραπαμυκίνης στην ομάδα PHN-RAPA που μετρήθηκαν κατά την θυσία ήταν  $12,5 \pm 0,76 \text{ ng/ml}$  (βλέπε πίνακα 2).



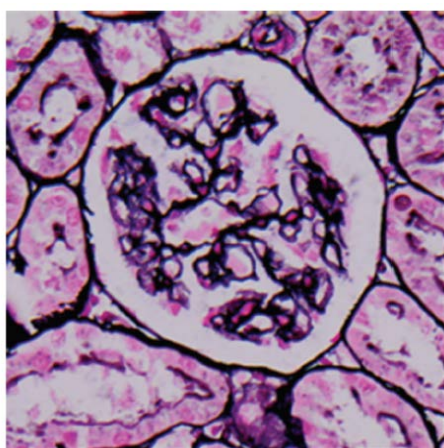
	PHN	Ομάδα PHN-RAPA	HC	PHN προς PHN-RAPA	P PHN προς HC	PHN - RAPA προς HC
Αρχικό βάρος (gr)	170±2.8	169±5.2	180± 2,1	0.9	0.12	0.1
Τελικό βάρος σώματος (gr)	335.7±7.3	268.3±12.1	432.5±9.2	<0.001	<0.001	<0.001
Νεφρική μάζα (gr)	4.3±0.3	2.8±0.2	4.04±0.02	0.001	0.47	0.009
Νεφρική μάζα/σωματικό βάρος	0.013±0.0002	0.01±0.0004	0.009±0.0003	0.013	0.002	0.27
Κρεατινίνη ορού (mg/dl)	0.3±0.001	0.31±0.03	0.4±0.001	0.55	0.006	0.016
Ολικές πρωτεΐνες ορού (mg/dl)	5.9±0.14	6.33±0.12	6.77±0.075	0.032	0.001	0.04
Λευκωματίνη ορού (mg/dl)	2.8±0.09	3.1±0.1	3.6±0.04	0.03	0.002	0.04
Ολική χοληστερόλη ορού (Mg/dl)	187.5±21	313.3±53	66±5	0.03	0.05	0.001

*Πίνακας 2. Πρωτεϊνουρία, σωματομετρικά χαρακτηριστικά και βιοχημικοί δείκτες. Στον πάνω πίνακα φαίνεται ξεκάθαρα ότι οι αρουραίοι PHN-RAPA*

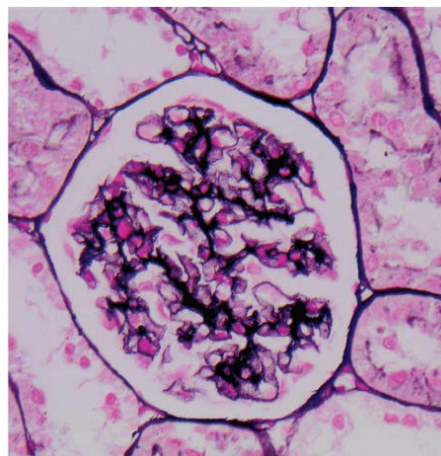
υποτριπλασίασαν την πρωτεϊνουρία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μείωση της πρωτεϊνουρίας άρχισε κατά την αυτόλογη φάση του πειράματος. Στον κάτω πίνακα φαίνεται ότι η μείωση της πρωτεϊνουρίας συνοδεύεται με αποκατάσταση της νεφρομεγαλίας (ομαλοποίηση του λόγου νεφρικής μάζας προς σωματικό βάρος και της υπολευκωματιναιμίας).

### 3.2 Φωτονικό μικροσκόπιο, ανοσοφθορισμός και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η χρώση αργύρου δείχνει σαφέστατα τη μείωση του πάχους της βασικής μεμβράνης στους PHN-RAPA αρουραίους έναντι των PHN αρουραίων. Στους πάσχοντες, η βασική μεμβράνη ήταν σοβαρά πεπαχυσμένη (εικόνα 15A, χρώση Αργυρού, x400) σε σχέση με εκείνα που έλαβαν θεραπεία, που όπως φαίνεται παρουσίασαν ήπιες και μόνο κατά τόπους μέτριες ιστολογικές αλλοιώσεις (εικόνα 15B, χρώση Αργυρού, x400).



15A

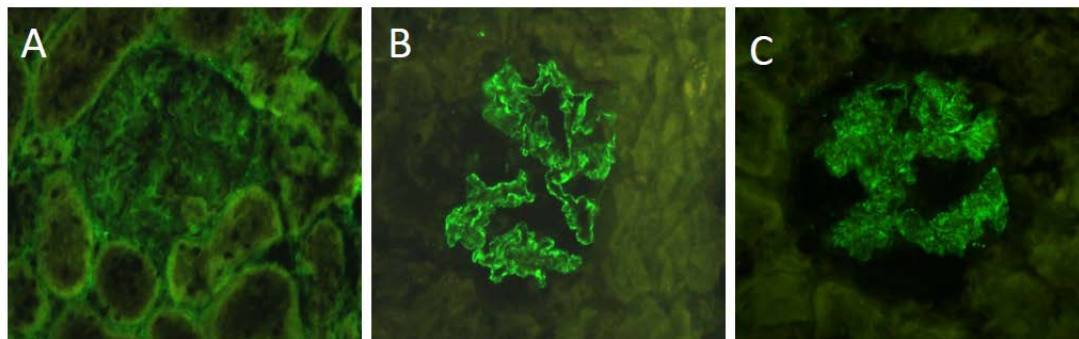


15B

*Εικόνες 15A και 15B: Εικόνες φωτονικού μικροσκοπίου με χρώση Αργύρου x400. Η εικόνα 15A προέρχεται από την ομάδα PHN και η εικόνα 15B από την ομάδα PHN-RAPA. Παρατηρείται μείωση του πάχους της βασικής μεμβράνης στην εικόνα 15B έναντι της 15A*

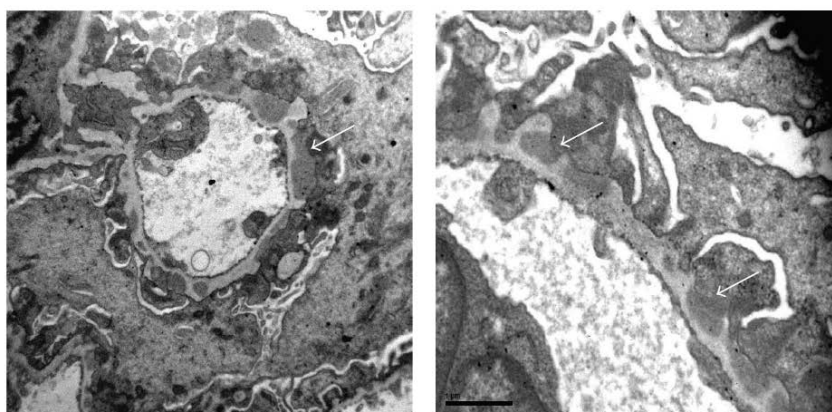
Ο ανοσοφθορισμός, με χρώση για anti-rat IgG, δείχνει έντονη (+3) κοκκιώδη εναπόθεση με ανώμαλη κατανομή κατά μήκος των πειραματικών τριχοειδικών μεμβρανών στους πάσχοντες αρουραίους (Εικόνα 16B) έναντι των θεραπευμένων

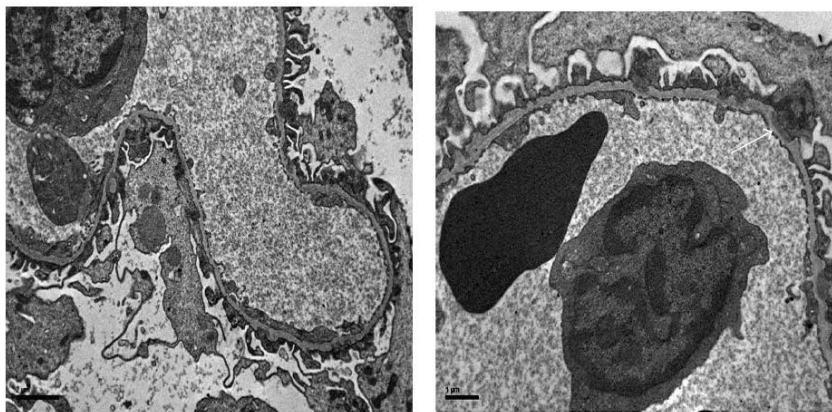
που είχαν μόνο ήπιες εναποθέσεις (Εικόνα 15C) και των φυσιολογικών που δεν είχαν καθόλου εναποθέσεις IgG (Εικόνα 16A).



*Εικόνα 16. Χρώση για anti-rat IgG για φυσιολογικούς (A), πάσχοντες (B) και υπό θεραπεία (C) αρουραίους. Όπως φαίνεται στην εικόνα C η ομάδα PHN-RAPA έχει ήπιες μόνο anti-rat IgG εναποθέσεις.*

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξε μαζικές υποεπιθηλιακές εναποθέσεις σε όλες τις αγγειακές αγκύλες των αρουραίων που δεν έλαβαν αγωγή που συνοδεύονταν από σοβαρές βλάβες στην αρχιτεκτονική των ποδοκυττάρων των (17 Πάνω Εικόνες). Αντίθετα, στην κάτω ομάδα των εικόνων, όπου απεικονίζονται σπειράματα αρουραίων οι οποίοι έλαβαν ραπαμυκίνη, οι βλάβες ήταν πολύ ελαφρότερες.





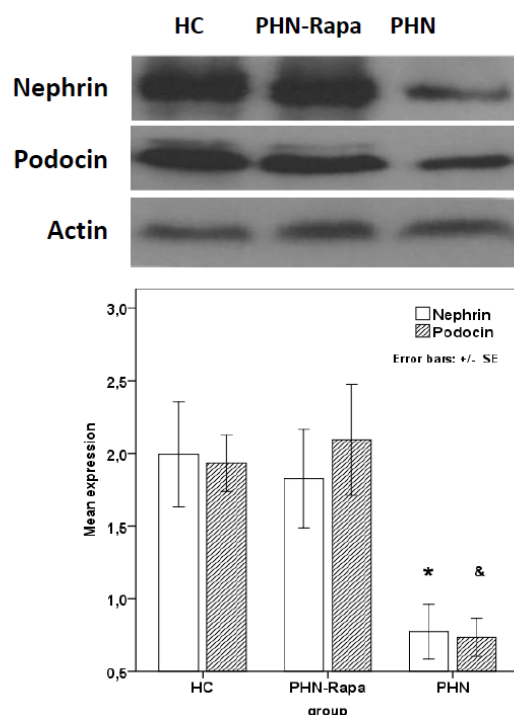
*Εικόνα 17: Στο Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αναδεικνύεται η βελτίωση στην αρχιτεκτονική των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων. Στις επάνω εικόνες απεικονίζονται σπειράματα αρουραίων που δεν έλαβαν θεραπεία με πάχυνση της βασικής μεμβράνης, απώλεια των ποδικών εκβλαστήσεων και ανοσοεναποθέσεις. Στις κάτω εικόνες σπειράματα αρουραίων στους οποίους χορηγήθηκε ραπαμυκίνη με σαφή βελτίωση της αρχιτεκτονικής δομής της βασικής μεμβράνης και των ποδοκυττάρων.*

Ειδικότερα, ο αρμονικός μέσος και η μέση τιμή του πάχους των ποδικών εκβλαστήσεων (FPW) ήταν 830,78nm και 789,26nm, αντίστοιχα, ενώ η μέση πυκνότητα των ποδικών εκβλαστήσεων ήταν (FDP)  $0,94 \pm 0,42$ , για κάθε  $\mu\text{m}$  της βασικής μεμβράνης. Στην PHN-RAPA ομάδα, οι εναποθέσεις και η ποδοκυτταρική βλάβη ήταν σαφώς μικρότερη σε σχέση με την PHN ομάδα μελέτης (ο αρμονικός μέσος των ποδικών εκβλαστήσεων (FPW) ήταν 613,3nm, η μέση τιμή 654nm και η πυκνότητα των ποδικών εκβλαστήσεων (FDP)  $1,28 \pm 0,9$ ; με ολικό  $P < 0,001$ ). Οι αντίστοιχες τιμές των μαρτύρων αρουραίων HC ήταν σαφώς μικρότερες (ο αρμονικός μέσος των ποδικών εκβλαστήσεων (FPW) ήταν 349nm, η μέση τιμή 355nm και η πυκνότητα των ποδικών εκβλαστήσεων (FDP)  $2,24 \pm 0,43$ ; με ολικό  $P < 0,001$ ).

### **3.3 Έκφραση νεφρίνης και ποδοσίνης**

Τα επίπεδα νεφρίνης και ποδοσίνης ήταν σαφώς μικρότερα στα PHN ζώα σε σχέση με την ομάδα που έλαβε θεραπεία και τους υγιείς μάρτυρες ( $P < 0,05$ ) όταν αυτά ελέγχθηκαν με Western Blot. Μάλιστα, τα επίπεδα των δυο ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών της σχισμής διήθησης είναι όμοια της PHN-RAPA, ομάδας με εκείνα της

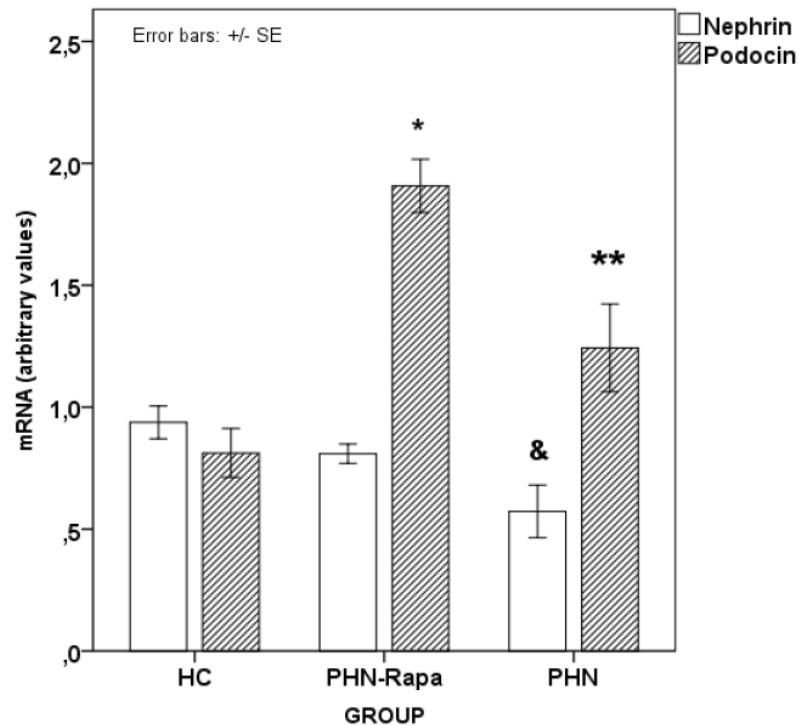
HC ομάδα. Στην εικόνα 18 που ακολουθεί φαίνεται ο λόγος νεφρίνης προς ακτίνη με  $*P = 0,01$  και ποδοσίνης προς ακτίνη με  $\&P = 0,007$ , αντίστοιχα.



Εικόνα 18: Πάνω: Αποτελέσματα της Western Blot της νεφρίνης, της ποδοσίνης και την ακτίνης. Κάτω : Μέση τιμή της πρωτεϊνικής έκφρασης νεφρίνης και ποδοσίνης (προσαρμογή ως προς ακτίνη). Φαίνεται ξεκάθαρα ότι με την ραπαμυκίνη αποκαθίσταται ποσοτικά η πρωτεϊνική έκφραση των ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών νεφρίνη και ποδοσίνη.

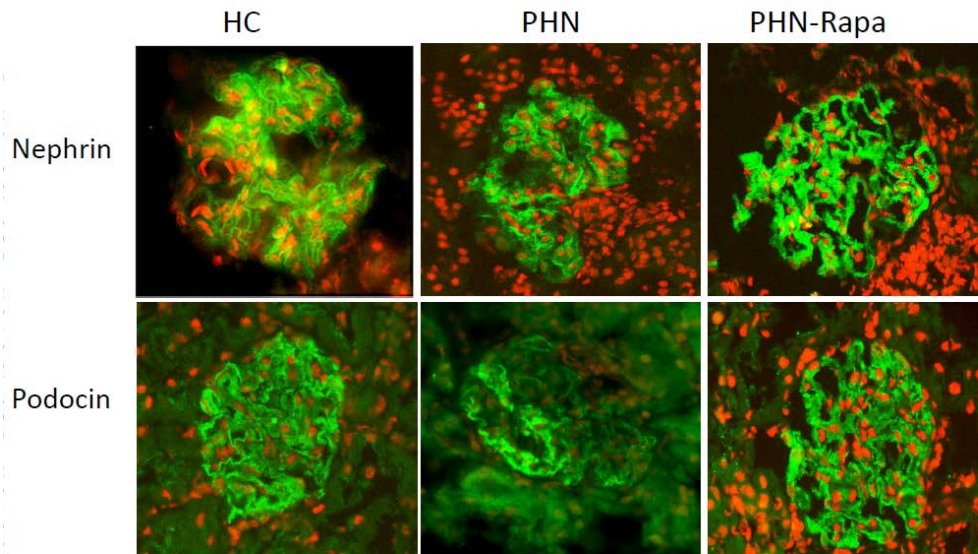
Τα αποτελέσματα της Real time PCR αντίθετα δεν ήταν τα αναμενόμενα. Ενώ όπως αναμενόταν το mRNA της νεφρίνης των PHN-RAPA, έχει την τάση να προσεγγίσει το mRNA των αρουραίων αναφοράς (HC), το mRNA της ποδοσίνης παρουσιάζει 100% αύξηση στην ομάδα PHN-RAPA σε σχέση με την ομάδα HC και 50% σε σχέση με τα παθολογικά ζώα PHN ( $\&P = 0,011$  για νεφρίνη και  $*P < 0,001$ ,  $**P = 0,038$  για ποδοσίνη, αντίστοιχα (βλέπε εικόνα 19).





Εικόνα 19: Real time PCR για προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης της νεφρίνης και της ποδοσίνης. Όπως φαίνεται η γονιδιακή έκφραση συμβαδίζει με την πρωτεϊνική έκφραση της νεφρίνης, εύρημα που δεν παρατηρείται με την ποδοσίνη.

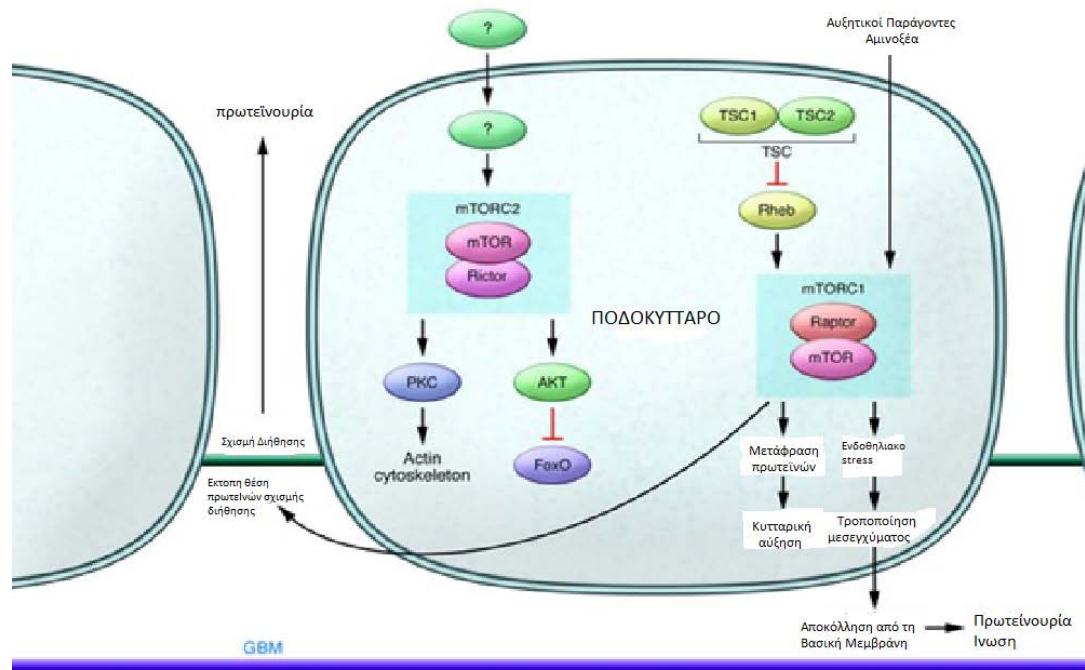
Ο ανοσοφθορισμός για την νεφρίνη και την ποδοσίνη έδειξε έντονη (+3) γραμμική εναπόθεση σε όλα τα εξεταζόμενα σπειράματα των υγιών ζώων. Αντίστοιχη εικόνα υπήρχε και στο 72,8% των θεραπευμένων ζώων (PHN-RAPA), εν αντιθέσει με την ομάδα PHN που δεν έλαβε αγωγή, ο ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες αυτές σε όλα σχεδόν τα σπειράματα ήταν τμηματικός και μικρότερης έντασης (βλέπε εικόνα 20).



*Εικόνα 20 : Ανοσοφθορισμός νεφρίνης πάνω και ποδοσίνης κάτω. Στους υγιείς αρουραίους (HC) και σε αυτούς που έλαβαν θεραπεία με ραπαμωκίνη (PHN-RAPA) υπήρχε έντονη γραμμική εναπόθεση. Αντίθετα στην ομάδα χωρίς θεραπεία (PHN) υπήρχε εκτεταμένη απουσία τόσο της ποδοσίνης όσο και της νεφρίνης. Αρχική μεγέθυνση: 400x.*

#### 4. Συζήτηση

Ο αρχικός ενθουσιασμός για την χρήση της ραπαμυκίνη σε πειραματικές παθήσεις, γρήγορα περιορίστηκε και φάνηκαν τα όρια και οι προϋποθέσεις χορήγησης της. Σε ανοσολογικά μοντέλα κυτταροτοξικότητας, φαίνεται να προάγει την πρωτεϊνουρία και την καταστροφή των ποδοκυττάρων<sup>172,184,219,219,221</sup>, ενώ σε μοντέλα χρόνιας πειραματικής και σωληναριοδιάμεσης φλεγμονής έχει νεφροπροστατευτική δράση, μειώνοντας την πρωτεϊνουρία και περιορίζοντας την φλεγμονώδη διεργασία. Επιπλέον αναστέλλει την διαμεσοσωληναριακή ίνωση και την υπερτροφία των σωληναριακών κυττάρων αναστέλλοντας αυξητικούς παράγοντες όπως την χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων (MCP-1), τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF), τον ενδοθηλιακό αυξητικό παράγον των αγγείων (VEGF) και τον αυξητικό παράγοντα μεταμόρφωσης-β, (TGF-β), καθώς και τις κυτταροκίνες IL2, IL4, IL7, IL8 και IL15<sup>168,210,211,212-218,222</sup>. Η μελέτη των McMahon και συν το 2012 έδειξε ότι η έκφραση του mTOR είναι ιδιαίτερα αυξημένη στα φυσιολογικά σωληναριακά κύτταρα και στα ποδοκύτταρα και ότι η δράση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTORC1 βρίσκεται κάτω από την επίδραση της ραπαμυκίνης<sup>226</sup>. Το γεγονός ότι παρατηρήθηκε επιτυχής συνεντόπιση του mTOR με την νεφρίνη ενισχύει την υπόθεση ότι η νεφρίνη αποτελεί διαβιβαστικό μόριο μεταφοράς σημάτων στο ποδοκύτταρο. Άλλωστε όπως διατυπώθηκε από τη Foggo το 2015, εξωτερικά μηνύματα τροποποιούν την δράση του mTORC1 και οδηγούν στην παραγωγή πρωτεϊνών που διαταράσσουν τις πρωτεΐνες της σχισμής διήθησης και επάγουν την πρωτεϊνουρία. Ταυτόχρονα και ο υποδοχέας mTORC2 δέχεται και αυτός μηνύματα από το περιβάλλον που μπορούν να επιτείνουν την πρωτεϊνουρία, την ποδοκυτταρική βλάβη και την ίνωση (βλέπε εικόνα 21)<sup>225</sup>. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί σε in vitro πειράματα ότι το σύμπλεγμα νεφρίνης, ποδοσίνης και CD2AP αλληλεπιδρά άμεσα με την p85 ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K επάγοντας έτσι τη φωσφορυλίωση της Akt, η οποία με τη σειρά της προάγει την επιβίωση των ποδοκυττάρων και αναστέλλει την απόπτωσή τους, μέσω φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Bad. Ωστόσο, αν και το μονοπάτι PI3K/Akt αντιπροσωπεύει τη μόνη μέχρι σήμερα γνωστή οδό μετάδοσης σήματος από την περιοχή του λεπτού διαφράγματος προς το εσωτερικό του κυττάρου, η σημασία του σε in vivo μοντέλα πρωτεϊνουρίας παραμένει εντελώς άγνωστη<sup>226</sup>.



Εικόνα 21 : Το ποδοκύτταρο βρίσκεται σε ισορροπία υπό την επίδραση των *mTORC1* και *mTORC2*. Το πρωταρχικό σήμα για την ενεργοποίηση του *mTORC2* δεν είναι γνωστό, όμως το σήμα για την ενεργοποίηση του *mTORC1* προέρχεται από αμινοξέα και αυξητικούς παράγοντες. Από: Agnes B. Fogio 2011

Η δράση της ραπαμυκίνη, όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος, οφείλεται στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των Β και Τ λεμφοκυττάρων<sup>208</sup> και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα Β λεμφοκύτταρα καθώς και στη προαγωγή της παραγωγής των ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ρύθμιση και αναστολή της ανοσολογικής απάντησης<sup>223</sup>. Η ραπαμυκίνη επίσης συμβάλλει στην ενεργοποίηση εναλλακτικών οδών των λεμφοκυττάρων μέσω φωσφορυλίωσης των ενεργοποιητών αντιγραφής STAT3-STAT5 οι οποίοι συμβάλλουν στην διαφοροποίηση των CD8 λεμφοκυττάρων σε κύτταρα μνήμης. Μειώνει το ενδοκυττάριο ασβέστιο στα Τ λεμφοκύτταρα με αποτέλεσμα να τροποποιείται το σήμα μέσω του υποδοχέα αντιγόνου του (TCR) και να παρατηρείται ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Στα μονοκύτταρα μειώνει τα επίπεδα του STAT3 με αποτέλεσμα να μειώνεται η ιντερλευκίνη IL10 και να αυξάνεται η δραστηριότητα της ιντερλευκίνης IL12 και του TNF-α<sup>224</sup>. Η διαφορετική φαρμακοκινητική της ραπαμυκίνης και ο διαφορετικός μηχανισμός δράσης της από εκείνων των

αναστολέων της καλσινευρίνης και της κυκλοφωσφαμίδης την καθιστά ελκυστική στην αντιμετώπιση ανοσολογικών νοσημάτων, όπως είναι η μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια<sup>209</sup>.

Στη παρούσα μελέτη, η ραπαμυκίνη χορηγήθηκε μετά την εγκατάσταση της μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας, την εμφάνιση της πρωτεϊνουρίας νεφρωσικού επιπέδου και την εγκατάσταση σοβαρών ιστολογικών βλαβών. Το αποτέλεσμα της χορήγησης του φαρμάκου ήταν η εξάλειψη της 2ης φάσης επιδείνωσης της πρωτεϊνουρίας, κατά τη διάρκεια της αυτόλογης φάσης. Η αρχική άνοδος της πρωτεϊνουρίας την πρώτη εβδομάδα χορήγησης της ραπαμυκίνης οφείλεται στη σοβαρότητα της διαμεσοσωληναριακής βλάβης που προκαλεί η ίδια η πρωτεϊνουρία γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από την εμπειρία χορήγησης ραπαμυκίνης σε μεταμοσχευμένους ασθενείς με πρωτεϊνουρία μεγαλύτερη του 1,5gr/24ωρο. Επιπλέον η ραπαμυκίνη δεν χορηγείται στην αρχική φάση της μεταμόσχευσης διότι καθυστερεί την επούλωση του χειρουργικού τραύματος, συνεπώς και στο μοντέλο του Heymann θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η καθυστερημένη ανταπόκριση οφείλεται στην αναστολή των αναγεννητικών μηχανισμών του σπειράματος.

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της 2<sup>η</sup> εβδομάδας όσον αφορά την πρωτεϊνουρία μέχρι το πέρας της μελέτης συνοδεύτηκαν με αντίστοιχη βελτίωση των ιστολογικών αλλοιώσεων. Αναλυτικότερα, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η μέση τιμή του πάχους των ποδικών εκβλαστήσεων (FPW) και η μέση πυκνότητα των ποδικών εκβλαστήσεων (FDP) βελτιώθηκαν σημαντικά με τη χορήγηση της ραπαμυκίνης, ενώ και η έκφραση των ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών νεφρίνης και ποδοσίνης αποκαταστάθηκε σχεδόν πλήρως. Είναι ενδιαφέρον ότι στην ομάδα PHN μειώθηκε τόσο το mRNA της νεφρίνης όσο και η συνοδός έκφρασή της, κάτι που δεν παρατηρήθηκε με την ποδοσίνη όπου η πρωτεϊνική έκφραση της ποδοσίνης μειώθηκε παρόλο που το mRNA της αυξήθηκε. Η απόκλιση αυτή υποδηλώνει μειωμένη μετάφραση της νεφρίνης στη PHN λόγω καταστολής του γονιδίου, ενώ η μείωση της ποδοσίνης οφείλεται σε απώλεια ή καταστροφή της πρωτεΐνης αυτής με αποτέλεσμα την αντισταθμιστική αύξηση του mRNA της. Οι εναπομείναντες ιστολογικές βλάβες στην ομάδα PHN-RAPA που έλαβε θεραπεία, αποδίδονται στην αρχική βλάβη που προκλήθηκε στην ετερόλογη φάση της μελέτης, πριν την χορήγηση της θεραπείας. Η μείωση του ανοσοφθορισμού της anti-rat IgG δηλώνει ότι η ραπαμυκίνη αναστέλλει την παραγωγή των αυτόλογων παθολογικών

αλλοαντισωμάτων (πιθανά μέσω αναστολής της παραγωγής τους από τα Β λεμφοκυττάρια), τα οποία είναι υπεύθυνα για τη δεύτερη φάση της πρωτεϊνουρίας, με αποτέλεσμα την σταδιακή ύφεση του νεφρωσικού συνδρόμου.

Συμπερασματικά η παρούσα μελέτη δείχνει ότι:

- 1) Η μείωση της πρωτεϊνουρίας έγινε κατά την αυτόλογη φάση του πειράματος όπου αναμενόταν να παραχθούν αντισώματα έναντι της μεγκαλίνης και να επιταθεί η πρωτεϊνουρία
- 2) Στη μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια, η ραπαμυκίνη δεν μειώνει απλά την πρωτεϊνουρία αλλά μεταβάλλει και την έκφραση των ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών (νεφρίνη-ποδοσίνη) . Με δεδομένο μάλιστα ότι ο κυτταροσκελετός αποτελεί οδό μεταφοράς σημάτων λειτουργίας και επιβίωσης του ποδοκυττάρου η μελέτη του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR και των εναλλακτικών οδών αποκτά νέο ενδιαφέρον

Η μονοθεραπεία με ραπαμυκίνη μπορεί να προλάβει πλήρως την εξέλιξη της νόσου εάν χορηγηθεί πρώιμα, αλλά και να αναστρέψει σε σημαντικό βαθμό τις εκδηλώσεις της ήδη εγκατεστημένης νόσου. Τα συμπεράσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αντίστοιχα σε άλλα ζωικά μοντέλα μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας<sup>168,210</sup> και δικαιολογούν περαιτέρω έρευνα και σε ανθρώπους ώστε να προσφέρουν μια νέα προοπτική για την θεραπεία της .

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 90 η ιδιοπαθής μεμβρανώδης σπειραματοπάθεια (IMN) ήταν η συχνότερη νεφροπάθεια σε ενήλικες άνδρες. Σταδιακά με την επέκταση των διαγνωστικών νεφρικών βιοψιών σε ισπανόφωνους και μαύρους το ποσοστό της έπεσε από το 30% στο 15-23% αλλά παραμένει η συχνότερη σπειραματοπάθεια σε ενήλικες άνδρες της καυκάσιας φυλής. Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από πάχυνση της βασικής μεμβράνης, με παρουσία υποεπιθηλιακών εναποθέσεων, εξάλειψη των ποδοειδών εκβλαστήσεων και σταδιακή παραγωγή νέας βασικής μεμβράνης πέριξ των εναποθέσεων (spikes) που σταδιακά οδηγεί στον εγκλωβισμό και αργότερα στην αποδόμηση αυτών. Παράλληλα παρατηρείται ελάχιστη έως ήπια αύξηση της κυτταροβρίθειας του σπειράματος και κοκκιώδεις εναποθέσεις IgG και C3 στον ανοσοφθορισμό.

Παθογενετικά στην ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια παρατηρείται *in situ* εναπόθεση αντισωμάτων υποεπιθηλιακά με ακόλουθη ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων κυκλοφορούντα αντισώματα είτε έναντι του υποδοχέα της φωσφολιπάσης A2 των ποδοκυττάρων (70% των περιπτώσεων IMN) είτε έναντι της θρομβοσπονδίνης τύπου-1 τμήματος περιέχουσα 7 A (10% των περιπτώσεων IMN), τα οποία έχουν αντίστοιχο ρόλο με τα αντισώματα έναντι μεγκαλίνης στο πειραματικό μοντέλο μεμβρανώδους σπειραματονεφρίτιδας των αρουραίων. Επίσης, έχει περιγραφεί ότι οι ουδέτερες ενδοπεπτιδάσες των ποδοκυττάρων σε νεογέννητα μωρά αποτελούν αντιγονικό επίτοπο στην αλλοάνοσο βρεφική μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια, όπως και η θετικά φορτισμένη βόεια πρωτεΐνη του ορού στην παιδική ηλικία. Τα αποτιθέμενα ανοσοσυμπλέγματα ενεργοποιούν το συμπλήρωμα και οδηγούν σε ανακατασκευή του κυτταροσκελετού, διαταραχή στην παραγωγή των πρωτεϊνών των σχισμών διήθησης και συνοδό λευκωματουρία. Ακολούθως παρατηρείται παθολογική παρουσία στην ποδοκυτταρική μεμβράνη ενδοκυττάρων πρωτεϊνών που λειτουργούν ως νέοι αντιγονικοί επίτοποι, εκλύοντας ένα δεύτερο κύμα ανοσολογικής απάντησης με παραγωγή IgG4 αντισωμάτων.

Σε πειραματικό επίπεδο το μοντέλο της νεφρίτιδας του Heymann αποτελεί ένα πιστό πρότυπο της IMN στον άνθρωπο. Στο ενεργητικό μοντέλο η ανοσοποίηση των Lewis αρουραίων γίνεται με εκχύλισμα επιθηλιακών πρωτεϊνών των ποδοκυττάρων (Fx1A).

Στο παθητικό μοντέλο χορηγείται ενδοφλεβίως ο ετερόλογος αντιορός έναντι των επιθηλιακών κυττάρων (antiFx1A), ο οποίος εντός ωρών προκαλεί εναπόθεσεις υποεπιθηλιακά. Μετά από 5 μέρες, εμφανίζεται πρωτεϊνουρία στο 100% των αρουραίων. Η ετερόλογη φάση ακολουθείται μετά 15 μέρες από μια αυτόλογη φάση, όπου IgG αντισώματα παράγονται έναντι των ετερόλογων IgG. Τα αυτόλογα IgG αλλοαντισώματα, εναποτίθενται και αυτά υποεπιθηλιακά, επιδεινώνοντας την πρωτεϊνουρία μιμούμενα την ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια στον άνθρωπο. Σε αυτή την περίοδο παράγονται αυτοαντισώματα έναντι ενός εξωγενούς αντιγόνου, καθώς και νεοαντιγόνων που εμφανίζονται υποεπιθηλιακά, κατά τη διάρκεια της αρχικής βλάβης. Συνεπώς, η αυτόλογη (2η) φάση της παθητικής νεφρίτιδας του Heymann είναι αυτή που μιμείται τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που περιγράφονται στη σύγχρονη βιβλιογραφία για την ιδιοπαθή μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια του ανθρώπου.

Κλινικά η νόσος εκδηλώνεται συνήθως με οιδήματα, λευκωματουρία νεφρωσικού επιπέδου, υποαλβουμιναιμία, δυσλιπιδαιμία και παθολογικό ίζημα ούρων (λιπιδουρία, σπειραματικά ερυθρά και επιθηλιακά κύτταρα). Σε αρχικά στάδια η σπειραματική διήθηση μπορεί να είναι φυσιολογική.

Η θεραπεία της IMN είναι συνάρτηση βαρύτητας της πρωτεϊνουρίας, της νεφρικής λειτουργίας και των βιοπτικών ευρημάτων κατά τη διάγνωση. Συνήθως σε περιπτώσεις ασθενών με λευκωματουρία έως και 8 gr/24ωρό και φυσιολογική κρεατινίνη η θεραπεία είναι συντηρητική και περιλαμβάνει αναστολείς του άξονα ρενίνης αγγειοτασίνης αλδοστερόνης, στατίνες και ενίοτε αντιθρομβωτική αγωγή. Αν ο ασθενής μετά από 6 μήνες συντηρητικής αντιμετώπισης δεν βελτιωθεί ή επιδεινωθεί τότε προκύπτει ανάγκη για χορήγηση ανοσοκαταστολής. Μέχρι και σήμερα η ανοσοκατασταλτική θεραπεία πρώτης γραμμής στηρίζεται στο κλασικό ή τροποποιημένο 6μηνο σχήμα μηνιαίας εναλλαγής κορτιζόνης και χλωραμβουκίλης ή κυκλοφωσφαμίδης (κλασικό ή τροποποιημένο σχήμα Ponticelli αντίστοιχα). Την τελευταία 5ετία η είσοδος της ριτουξιμάμπης στη θεραπευτική φαρέτρα και οι ανακαλύψεις για την παθογένεια της νόσου, προσέδωσαν μεγαλύτερη προσοχή στο ρόλο των B λεμφοκυττάρων και των IgG ανοσοσφαιρινών που παράγουν. Η ανοσοκατασταλτική δράση της ραπαμυκίνης αποδόθηκε αρχικά στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων. Πρόσφατα όμως περιγράφηκε και ο



πρόσθετος ρόλος της στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των Β λεμφοκυττάρων και στον περιορισμό της ικανότητας τους να παράγουν ανοσοσφαιρίνες.

Οι Bonegio και συνεργάτες το 2005 έδειξαν ότι μικρή δόση ραπαμυκίνης υποστρέφει την πρωτεϊνουρία σε πειραματικό μοντέλο μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας και παράλληλα μειώνει τη διαμεσοσωληνιακή ίνωση και φλεγμονή μέσω μείωσης της έκφρασης προφλεγμονωδών και προϊνωτικών παραγόντων. Η ευεργετική επίδραση της ραπαμυκίνης έχει αναδειχθεί και σε μοντέλο ενεργητικής νεφρίτιδας του Heymann. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εξεταστεί η επίδραση της ραπαμυκίνης στην πρωτεϊνουρία και στην ιστοπαθολογική βλάβη σε πειραματικό μοντέλο μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας. Η καινοτομία της εργασίας αυτής έγκειται στη μελέτη της επίδρασης της ραπαμυκίνης στην έκφραση των ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών του διαφράγματος της σχισμής διήθησης, νεφρίνη και ποδοσίνη, αλλά και στο σχεδιασμό της καθώς αφορά μόνο στη 2<sup>η</sup> φάση της παθητικής νεφρίτιδας του Heymann όταν έχει ήδη εγκατασταθεί η αρχική βλάβη, όπως ακριβώς συμβαίνει και στην κλινική πράξη.

Υλικά και Μέθοδοι:

Η αναπαραγωγή του μοντέλου της M.N. αναπτύχθηκε με την ενδοφλέβια χορήγηση 0,5ml antiFx1/100gr σωματικού βάρους σε 12 αρουραίους Sprague Dolley. Ο ορός antiFx1 ήταν ευγενική χορηγία του Dr Kerjaschki. Μετά από 7 μέρες σε 6 από αυτούς χορηγήθηκε υποδορίως ραπαμυκίνη 0.5mg/kg σωματικού βάρους (PHN-RAPA) ενώ οι υπόλοιποι χρησίμευσαν ως συγκριτική ομάδα μελέτης πασχόντων από M.N (PHN). Επίσης υπήρχε και μια τρίτη ομάδα με 6 φυσιολογικούς αρουραίους οι οποίοι δεν έλαβαν καμία θεραπεία (Control). Ακολούθησαν συλλογές ούρων μια φορά την εβδομάδα για 7 εβδομάδες και στη πέρας της 7<sup>ης</sup> εβδομάδας όλα τα ζώα θυσιάστηκαν. Ένα μέρος νεφρικού ιστού χρησιμοποιήθηκε για φωτονικό, ανοσοφθορισμό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ενώ το υπόλοιπο διαμοιράστηκε για τη μελέτη των ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών νεφρίνης και ποδοσίνης με PCR και Western Blot. Παράλληλα μετρήθηκαν μεταβολικοί δείκτες θρέψης, η κρεατινίνη καθώς και τα επίπεδα ραπαμυκίνης ορού. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ANOVA με διόρθωση κατά Bonferroni. Στατιστικά σημαντικές ήταν η διαφορές με p μικρότερο από 0,05 ενώ για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS17.

### Αποτελέσματα:

Στις συλλογές ούρων 24ωρου επιβεβαιώθηκε ότι η ομάδα PHN-RAPA καθώς και η ομάδα PHN είχαν πρωτεϊνουρία νεφρωσικού επιπέδου την 7<sup>η</sup> μέρα (οπότε χορηγήθηκε η ραπαμυκίνη) και η οποία παρέμεινε σταθερά υψηλή μέχρι την 14η μέρα. Μετά τη 14<sup>η</sup> μέρα παρατηρήθηκε βελτίωση της πρωτεϊνουρίας στην ομάδα PHN-RAPA, ενώ στο πέρας των 7 εβδομάδων η πρωτεϊνουρία μειώθηκε στο 1/3 στην ομάδα PHN-RAPA σε σύγκριση με την ομάδα PHN ( $p=0.007$  στην post hoc ανάλυση) ποτέ όμως δεν έφτασε τα επίπεδα της ομάδας Control ( $p<0.001$ ). Όσον αφορά στους δείκτες θρέψης οι ολικές πρωτεΐνες και η αλβουμίνη ήταν υψηλότερες στην ομάδα PHN-RAPA έναντι της PHN ενώ το σωματικό βάρος ήταν μικρότερο. Τα επίπεδα ραπαμυκίνης την ημέρα θανάτωσης των αρουραίων ήταν  $12,5 \pm 0.76 \text{ ng/ml}$  στην ομάδα PHN-RAPA.

Η ιστολογική χρώση αργύρου έδειξε βελτίωση του πάχους της σπειραματικής βασικής μεμβράνης στην ομάδα PHN-RAPA έναντι της ομάδας PHN. Στον ανοσοφθορισμο οι IgG εναποθέσεις μειώθηκαν κατά 1 με 2 τάξεις μεγέθους (από 3+ σε 1+ με 2+) ενώ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκε περιορισμός των εναποθέσεων και στατιστικά σημαντική ( $p<0.001$ ) μείωση του πάχους την βασική μεμβράνης στην ομάδα της ραπαμυκίνης.

Όσον αφορά στην έκφραση των ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών με Western Blot, τα επίπεδα νεφρίνης και ποδοσίνης μειώθηκαν στην ομάδα PHN ενώ διατηρήθηκαν σε φυσιολογικά επίπεδα στην ομάδα PHN-RAPA. Αντίστοιχα και στον ανοσοφθορισμό η έκφραση νεφρίνης και ποδοσίνης αποκαταστάθηκε στην ομάδα της ραπαμυκίνης. Στην PCR η έκφραση του mRNA της νεφρίνης ακολούθησε την πρωτεϊνική έκφραση κάτι που δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση της ποδοσίνης.

### Συμπέρασμα :

Η ραπαμυκίνη φαίνεται να περιορίζει την πρωτεϊνουρία και να αποκαθιστά τη βλάβη στα ποδοκύτταρα σε μοντέλα ανοσολογικής τοξικότητας. Στην μεμβρανόδη σπειραματοπάθεια ιδιαίτερο ρόλο έχουν τα IgG αυτοαντισώματα, οπότε παρεμβάσεις έναντι παθολογικών B λεμφοκυτταρικών κλώνων μπορεί να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα. Η Ραπαμυκίνη αναστέλλει την ανάπτυξη των B και T λεμφοκυττάρων καθώς και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών. Επιπλέον προάγει την

παραγωγή ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων που περιορίζουν αυτοδραστικούς B-λεμφοκυτταρικούς κλώνους.

Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο η ραπαμυκίνη χορηγήθηκε αφού είχε εγκατασταθεί η βλάβη και φάνηκε να περιορίζει την πρωτεϊνουρία, να υποστρέφει τις ιστολογικές αλλοιώσεις και να επαναφέρει την έκφραση των ποδοκυτταρικών πρωτεϊνών στη ομάδα PHN-RAPA κατά την αυτόλογη φάση του πειράματος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ότι η μείωση των ανοσοσυμπλεγματικών εναποθέσεων συνέβη κατά την αυτόλογη φάση του πειράματος, γεγονός που δείχνει ότι η δράση της ραπαμυκίνης επιτελείται τόσο μέσω καταστολής της παραγωγής παθολογικών ανοσοσφαιρινών από τα B λεμφοκύτταρα όσο και λόγω αποκατάστασης των πρωτεϊνών της σχισμής διηθήσεως. Συνεπώς η ραπαμυκίνη θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτική επιλογή για τη μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες.

## ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Up until the end of 1990's idiopathic membranous nephropathy (IMN) was the most frequent nephropathy among male adults. Gradually, due to the extension of diagnostic renal biopsies to the poorer spanish-spoken and black population, the frequency of IMN was reduced from 30% to 15-23% but remained the most common glomerulopathy among adult male Caucasians. IMN is characterized by thickening of the glomerular basement membrane (GBM), subepithelial deposition of immune complexes, eradication of the foot processes and progressive extension of basement membrane all-around the depositions (spikes), in order to isolate and absorb them. Alongside, IgG and C3 deposits are detected by immunofluorescence whereas the cellularity of the glomerular tuft is not substantially increased.

Pathogenetically, IMN is caused by the deposition of autoantibodies in the subepithelial aspect of the GBM and the subsequent activation of complement. Recent studies have shown that the antigenic target of the circulating antibodies in the majority of cases of IMN (70%) is phospholipase A2 receptor (PLA2R) and to a lesser degree (10%), thrombospondin type I domain containing 7A (THSD7A) which are present on podocytes as is megalin in rat models of MN. Similarly, neutral endopeptidase has been found as the target antigen in newborns' podocytes with alloimmune neonatal membranous nephropathy, cationic bovine serum albumin as a planted antigen in early childhood MN and circulating auto-antibodies against human male antigens. The immunocomplex depositions activate complement, leading to reorganization of podocytic cytoskeleton, elimination of the slit diaphragm proteins and eventually to proteinuria. Additionally intracellular proteins and cryptic epitopes may be exposed, thus inducing "a second wave of immunisation".

Heymann Nephritis is a faithful experimental model of the disease that has been extensively studied since first described by Heymann et al. in 1959. The active model of HN is induced by immunization of Lewis rats with preparations of brush-border proteins. The passive model of HN (PHN) is induced by a single i.v. injection of heterologous anti-brush border antiserum (anti-Fx1A) that produces heterologous IgG subepithelial deposits within hours to days. Proteinuria occurs in all animals within five days. This "heterologous phase" is followed, two weeks later, by an "autologous phase" during which rat IgG antibodies are produced against the heterologous IgG.

The autologous IgG alloantibodies are also deposited at the subepithelial space, inducing a further increase in proteinuria. The second (autologous) phase of PHN mimics idiopathic MN because during the autologous phase there is production of autoantibodies, against a planted exogenous antigen but also against neoantigens that are exposed in the subepithelial space during the initial injury. Therefore it is the autologous phase of passive HN that shares the same pathophysiological mechanisms to those recently identified in idiopathic MN in humans.

The clinical manifestations of the disease include peripheral edema, nephrotic range proteinuria, hypoalbuminemia, dyslipidemia and abnormal urine sediment (oval fat bodies, red blood cells of glomerular origin, and occasionally epithelial cells). In the initial phase, glomerular filtration rate may be maintained at normal levels.

The therapeutic approach depends on the severity of proteinuria, the degree of renal dysfunction and the renal biopsy findings at the time of diagnosis. Usually in patients with proteinuria less than 8gr/24h and normal renal function are treated conservatively with inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone axis, statins and occasionally with antithrombotic agents. If, after 6 months of conservative treatment, nephrotic syndrome and/or kidney function are not improving or even they are deteriorating then the need for immunosuppressive therapy arises. The immunosuppressive treatment of choice remains the monthly alterations of chlorambucil or cyclophosphamide with steroids (classic or alternative Ponticelli scheme). The new discoveries regarding the implication of auto-antibodies in the pathogenesis of IMN and the recent introduction of rituximab (which targets B-lymphocytes) in our armamentarium made the use of this monoclonal antibody an attractive new therapeutic choice that gradually proves to be effective.

Moreover the new discoveries regarding the immunosuppressive actions of the mTOR inhibitors rapamycin and everolimus on the inhibition of humoral immunity make these agents also attractive for the treatment of IMN. Bonegio et al. demonstrated that low dose rapamycin ameliorated proteinuria in experimental PHN and limited tubulointerstitial inflammation and interstitial fibrosis in association with reduced expression of proinflammatory and profibrotic genes. The beneficial effects of rapamycin have also been observed in active HN. Here we tried to investigate more specific effects of rapamycin, beyond the known antifibrotic ones. In particular we

examined the effect of rapamycin on podocytes architecture and slit diaphragm proteins nephrin and podocin, as well as on the deposition of pathogenic autoantibodies that coincides with the autologous phase of PHN.

### **Methods:**

Passive Heymann Nephritis (PHN) was induced by a single i.v infusion of 0.5ml anti-Fx1 per 100gr of body weight, in 12 Sprague-Dawley male rats. The anti-Fx1 is a generous donation from Dr Kerjascki. One week later, six of these rats commenced daily subcutaneous injections of Rapamycin 0.5 mgr/Kg (PHN-RAPA group). The remaining six rats with PHN were used as the proteinuric control group (PHN group) while six more rats without PHN were used as the healthy control group (Control). Weekly 24-hour urine collections were made over the following 7 weeks and the animals were sacrificed at the end of the 7<sup>th</sup> week. Renal tissue was processed for photon and electron microscopy studies as well as for PCR and Western Blot analysis of the slit diaphragm proteins podocin and nephrin. Alongside chemical tests for creatinine, metabolic markers and rapamycin blood levels were measured. For the comparison of urine protein levels between groups, repeated measures ANOVA with Bonferroni correction in post hoc analysis was used. Statistically significant differences were considered if p was less than 0,05 and for the statistical analysis SPSS17 was used.

### **Results:**

At the end of the 7<sup>th</sup> day (when rapamycin was given to the PHN-RAPA group) both PHN and PHN-RAPA groups displayed severe nephrotic range proteinuria which was sustained until the end of the second week. At this time proteinuria started to continuously decline in the PHN-RAPA group while it remained stable in the PHN group. At the end of the seven weeks period, proteinuria was reduced to the 1/3 of that of the comparator PHN group ( $p=0.007$  in post hoc analysis). However, proteinuria in the PHN-RAPA group approached but did not reached the normal levels of the control group ( $p<0.001$ ). Concerning the metabolic indices total protein and albumin improved in the PHN-RAPA group, although body weight was reduced compared to the PHN group. Histological lesions were markedly improved by rapamycin. Immunofluorescence revealed attenuated deposits of autologous alloantibodies in

treated rats. Untreated rats showed decreased glomerular content of both nephrin and podocin whereas rapamycin restored their expression.

Electron microscopy showed reduction of the deposits and GBM width closer to normal.

### **Conclusions:**

Rapamycin has shown to reduce proteinuria and to restore histological lesions in experimental models of immune toxicity. B lymphocytes and autoantibodies play a crucial role in the pathogenesis of membranous nephropathy. Rapamycin inhibits the production of both B and T lymphocytes and promotes the expansion of regulatory T cells which inhibit auto-reactive B-clones.

The present study showed that the administration of Rapamycin after the appearance of the nephrotic syndrome reduced proteinuria, restored the histological lesions and the expression of podocyte proteins nephrin and podocin during the autologous phase of PHN. The elimination of immune deposits during the second phase of PHN, implies that rapamycin depressed allo- and auto-reactive B clones, while on the other hand it restored the normal expression of podocytic proteins crucial for the integrity of the glomerular sieve. Therefore rapamycin could be considered as a new therapeutic choice for membranous nephropathy in the future either alone or combined with other immunosuppressive agents.

### **Βιβλιογραφία**

- 1) Guyton, AC, & Hall, JE (2000). Φυσιολογία του ανθρώπου και μηχανισμοί των νόσων. Αθήνα, Επιστημονικές εκδόσεις «Γρηγ. Παρισιάνος».
- 2) Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anatomy and embryology* 1995; 192(5): 385-397.
- 3) Saxen L, Lehtonen E. Embryonic kidney in organ culture. *Differentiation* 1987; 36: 2-11.
- 4) Srivastava T, Garola RE, Whiting JM, et al. Cell cycle regulatory proteins in podocyte cell in idiopathic nephritic syndrome of childhood. *Kidney Int* 2003; 63: 1374-1381.
- 5) Κουτρούτσος ΚΚ, Νακοπούλου Α. Ποδοκύτταρο και σπειραματοπάθειες. *Ελληνική νεφρολογία* 2009; 21(4): 237-281.
- 6) Neal C, Crook H, Bell E, et al. Three-dimensional reconstruction of glomeruli by electron microscopy reveals a distinct restrictive urinary subpodocyte space. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1223-1235.
- 7) Laurie G W, Leblond C P, Inoue S, et al. Fine structure of the glomerular basement membrane and immunolocalization of five basement membrane components to the lamina densa (basal lamina) and its extensions in both glomeruli and tubules of the rat kidney. *American journal of anatomy* 1984; 169(4): 463-481.
- 8) Abrahamson, D. R. Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 1987; 253(5): F783-F794.
- 9) Horvat R, Hovorka A, Dekan G, et al. Endothelial cell membranes contain podocalyxin--the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *The Journal of cell biology* 1986; 102(2): 484-491.



- 10) Latta H. An approach to the structure and function of the glomerular mesangium. *Journal of the American Society of Nephrology* 1992; 2(10) : s65-s73
- 11) Farquhar, M. G. (1988). The glomerular basement membrane. In *Cell biology of extracellular matrix*. Springer US.
- 12) Τσιμπώνης Α, Νικοδημοπούλου Μ, Γκρέκας Δ. Ο ρόλος των ποδοκυττάρων στην παθογένεια της διαβητικής νεφροπάθειας. *Ελληνική Νεφρολογία* 2009; 21(4): 282-291.
- 13) Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575-582.
- 14) Ahola H, Heikkilä E, Aström E, et al. A novel protein, densin, expressed by glomerular podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1731-1737.
- 15) Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *The Journal of cell biology* 1984; 98(4): 1591-1596.
- 16) Hugo C, Nangaku M, Shankland SJ, et al. The plasma membrane- actin linking protein, ezrin, is a glomerular epithelial cell marker in glomerulogenesis, in the adult kidney and in glomerular injury. *Kidney Int* 1998; 54: 1934–1944.
- 17) Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F562–F573.
- 18) Kreidberg JA. Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 548-553.

- 19) Blattner SM, Kretzler M. Integrin-linked kinase in renal disease: connecting cell-matrix interaction to the cytoskeleton. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14: 404-410.
- 20) Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1583-1587.
- 21) Henry MD, Campbell K P. A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* 1998; 95(6): 859-870.
- 22) Kretzler M, Teixeira V, Unschuld P, et al. Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria. *FASEB J* 2001; 15: 1843-1845.
- 23) Wu C, Dedhar S. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *The Journal of cell biology* 2001; 155(4): 505-510.
- 24) Pollard TD. Actin. *Curr Opin Cell Biol* 1990; 2: 33-40.
- 25) Mundel P, Heid HW, Mundel TM, et al. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 1997; 139: 193–220.
- 26) Asanuma K, Kimk K, Oh J, et al. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform- specific manner. *J Clin Invest* 2005; 115: 1188-1198.
- 27) Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al. Mutations in ACTNA, encoding alpha-actinin-4, cause familial segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24: 251-256.
- 28) Endlich N, Kress K, Reiser J, et al. Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 413-422.

- 29) Kim Y, Goyal M, Wharram B, et al. GLEPP1 receptor tyrosine phosphatase (Ptpro) in rat PAN nephrosis. A marker of acute podocyte injury. *Nephron* 2002; 90: 471-476.
- 30) Ponticelli C. Membranous nephropathy. *Journal of nephrology* 2007; 20(3): 268-287.
- 31) Ronco P, Debiec H. Molecular pathomechanisms of membranous nephropathy: from Heymann nephritis to alloimmunization. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005; 16(5): 1205-1213.
- 32) Lihua Bao, Richard J Quigg. Complement in Lupus Nephritis: The Good The Bad and the Unknown. *Seminars in Nephrology* : 2007; 27(1): 69-80.
- 33) Jefferson JA, Pippin JW, Shankland SJ. Experimental models of membranous nephropathy. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2010; 7(1): 27-33.
- 34) Beck JLH, Bonegio RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *New England Journal of Medicine* 2009; 361(1): 11-21.
- 35) Qin W, Beck, LH, Zeng C, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011; 22(6): 1137-1143.
- 36) Stanescu HC, Arcos-Burgos M, Medlar A, et al. Risk HLA-DQA1 and PLA2R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *New England Journal of Medicine* 2011; 364(7): 616-626.
- 37) Austin HA, & Illei GG. Membranous lupus nephritis. *Lupus* 2005; 14(1): 65-71.
- 38) Nicolas M. Tomas, M.D., Laurence H. Beck Jr., M.D. Ph.D., Catherine Meyer-Schwesinger, M.D., Barbara Seitz-Polski, M.D., Hong Ma, Ph.D., Gunther Zahner,

Ph.D., Guillaume Dolla, M.S. Elion Hoxha, Ph.D., Udo Helmchen, M.D., Anne-Sophie dabert-Gay Ph.D., Michael Merchant, Ph.D., Jon Klein, M.D. Ph.D., David J Salant, M.D., Rolf A.K. Stahl, M.D. and Gerard Lambeau, Ph.D. Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in Idiopathic Membranous Nephropathy. *New England Journal of Medicine* 2014 Dec 11; 371(24) : 2277-2287.

39) Markus Godel M.D., Florian Grahammer M.D., Tobias B. Huber, M.D. Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in Idiopathic Membranous Nephropathy *New England Journal of Medicine* 2015 Mar 12 ; 372(11) : 1073-1074.

40) Shah P, Tramontano A, Makker SP. Intramolecular epitope spreading in heymann nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 3060-3066.

41) Segal PE., Choi MJ. Recent advances and prognosis in idiopathic membranous nephropathy. *Advances in Chronic Kidney Disease* 2012; 19(2): 114-119.

42) Debiec H, Ronco P. PLA2R autoantibodies an PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 2011; 364: 689-690.

43) Beck LH Jr, Salant DJ. Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead. *Kidney Int.* 2010; 77: 765-770.

44) Lei Prng, Jing Ma, Rui Cui, Xiao Chen, Shi-Yao Wei, Qiu-Ju Wei, Bing Li. The calcineurin Inhibitor Tacrolimus reduces proteinuria in Membranous Nephropathy accompanied by a decrease in Angiotensin-Like-4 : . 2014 Aug 28; 9(8): 1-11

45) Meryl Waldmann and Howard A. Austin III. Treatment of Idiopathic Membranous Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2012; 23: 1617-1630

46) Hofstra JM, Branten AJ, Wirtz JJ, Noordzij TC, du Buf-Vereijken PW , Wetzels JF: Early versus late start of immunosuppressive therapy in Idiopathic

Membranous Nephropathy. A randomized controlled trial. *Nephron Dial Transplant* 2010 (25): 129-136

47) Du Buf--Vereijken PW, Branten AJ, Wetzels JF: Membranous Nephropathy Study Group: Cytotoxic therapy for Membranous Nephropathy and renal insufficiency: Improved renal survival but high relapse rate. . *Nephron Dial Transplant* 2004 (19): 1142-1148

48) Gwinner W, Plasger J, Brandes RP, et al. Role of xanthine oxidase in passive Heymann nephritis in rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 1999; 10(3): 538-544.

49) Chen ZH, Qin WS, Zeng CH, et al. Triptolide reduces proteinuria in experimental membranous nephropathy and protects against C5b-9-induced podocyte injury in vitro. *Kidney international* 2010; 77(11): 974-988.

50) Zoja C, Corna D, Rottoli D, et al. Effect of combining ACE inhibitor and statin in severe experimental nephropathy. *Kidney international* 2002; 61(5): 1635-1645.

51) Remuzzi G, Chiurciu C, Abbate M, Brusegan V, Bontebelli M, Ruggenti P. Rituximab for idiopathic membranous nephropathy. *Lancet* 2002; Dec 21-28 ; 360 (9350):2090.

52) Piero Ruggenti, Paolo Cravedi, Antonietta Chianca, Annalisa Perna, Barbara Ruggiero, Flavio Gaspari, Alessandro Rambaldi, Maddalena Marasa, Giuseppe Remuzzi. Rituximab in Idiopathic Membranous Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2012; 23 : 1416-1425.

53) Paolo Cravedi, Giuseppe Remuzzi, Piero Ruggenti. Rituximab in Primary Nephropathy: First-Line Therapy, why not? *Nephron Clin Pract* 2014; 128 : 261-269

54) Paolo Lorusso, Anna Bottai, Emanuella Mangione, Maurizio Innocenti, adamasco Cupisti, Maria Francesca Egili. Low-dose synythetic adrenocorticotropic

Hormone-analog therapy for nephritic patients: results from a single-center pilot study. *Int. J. Of Nephrology and Renovascular Disease* 2015; 8: 7-13

55) Alexopoulos E, Papagianni A, Tsamelashvili M, et al. Induction and long-term treatment with cyclosporine in membranous nephropathy with the nephrotic syndrome. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2006; 21(11): 3127-3132.

56) Jha V, Ganguli A, Saha TK, et al. A randomized, controlled trial of steroids and cyclophosphamide in adults with nephrotic syndrome caused by idiopathic membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2007; 18(6): 1899-1904.

57) Chan TM, Li FK, Tang CS, et al. Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. *New England Journal of Medicine* 2000; 343(16): 1156-1162.

58) Ponticelli C, Passerini P, Salvadori M, et al. A randomized pilot trial comparing methylprednisolone plus a cytotoxic agent versus synthetic adrenocorticotrophic hormone in idiopathic membranous nephropathy. *American journal of kidney diseases* 2006; 47(2): 233-240.

59) Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplantation proceedings* 2003; 35(3): S7-S14.

60) Harris TE, Lawrence JC, Jr. TOR signaling. *Sci STKE* 2003; 2003: re15.

61) Peterson R, Beal P, Comb M, et al. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem* 2000; 275: 7416-7423.

62) Brown E, Beal P, Keith C, et al. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 1995; 377: 441-446.

- 63) Choo A, Yoon S, Kim S, et al. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 17414-17419.
- 64) Peterson T, Laplante M, Thoreen C, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 2009; 137: 873-886.
- 65) Guertin D, Stevens D, Thoreen C, 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: 859-871.
- 66) Kim D, Sarbassov D, Ali S, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002; 110: 163-175.
- 67) Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem* 2003; 278: 15461-15464.
- 68) Hall M. The TOR signalling pathway and growth control in yeast. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 234-239.
- 69) Kim D, Sarbassov D, Ali S, et al. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 2003; 11: 895-904.
- 70) 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: 359-366.
- 71) Neshat M, Mellinghoff I, Tran C, et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10314-10319.

- 72) Borlado LR, Redondo C, Alvarez B, et al. Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo. *FASEB J* 2000; 14: 895-903.
- 73) Gingras A, Kennedy S, O'Leary M, et al. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 1998; 12: 502-513.
- 74) Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18: 1926-1945.
- 75) Dong L, Liu F. PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E187-196.
- 76) Feldman M, Apsel B, Uotila A, et al. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 2009; 7: e38.
- 77) Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307: 1098-1101.
- 78) Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009; 122: 3589-3594.
- 79) Potter C, Huang H, Xu T. Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell* 2001; 105: 357-368.
- 80) Inoki K, Li Y, Zhu T, et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 648-657.
- 81) Peng X, Xu P, Chen M, et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* 2003; 17: 1352-1365.



- 82) Huang J, Dibble C, Matsuzaki M, et al. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 4104-4115.
- 83) Sancak Y, Peterson T, Shaul Y, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2008; 320: 1496-1501.
- 84) Saucedo L, Gao X, Chiarelli D, et al. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 566-571.
- 85) Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, et al. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 2001; 294: 1942-1945.
- 86) Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008; 30: 214-226.
- 87) Inoki K, Zhu T, Guan K. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003; 115: 577-590.
- 88) Cheng S, Fryer L, Carling D, et al. Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem* 2004; 279: 15719-15722.
- 89) DeYoung MP, Horak P, Sofer A, et al. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* 2008; 22: 239-251.
- 90) Ma X, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 307-318.
- 91) Lee DF, Kuo HP, Chen CT, et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 2007; 130: 440-455.

- 92) Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ. Rapamycins: mechanisms of action and cellular resistance. *Cancer biology & therapy* 2003; 2(3): 222-232.
- 93) Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, et al. Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. *Transplantation* 1995; 59: 390-395.
- 94) El-Hashemite N, Zhang H, Henske E, et al. Mutation in TSC2 and activation of mammalian target of rapamycin signalling pathway in renal angiomyolipoma. *Lancet* 2003; 361: 1348-1349.
- 95) MacDonald A, Scarola J, Burke JT et al. Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus. *Clinical therapeutics* 2000; 22: B101-B121.
- 96) Περίληψη χαρακτηριστικών προϊόντος Rituximab 2 Ιουνίου 2008.
- 97) Lampen A, Zhang Y, Hackbarth I, et al. Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1998; 285(3): 1104-1112.
- 98) Yatscoff R, Wang P, Chan K, et al. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics, and therapeutic range investigations. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 666-671.
- 99) Chajed PN, Dickenmann M, Bubendorf L, et al. Patterns of pulmonary complications associated with sirolimus. *Respiration* 2006; 73(3): 367-374.
- 100) Grim SA, Slover CM, Sankary H, et al. Risk factors for wound healing complications in sirolimus-treated renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* 2006; 38(10): 3520-3523.

- 101) Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, et al. Treatment of severe aplastic anemia with a combination of horse antithymocyte globulin and cyclosporine, with or without sirolimus: a prospective randomized study. *Haematological* 2009; 94(3): 348-354.
- 102) Sánchez Fructuoso A, Calvo N, Moreno MA, et al. Study of anemia after late introduction of everolimus in the immunosuppressive treatment of renal transplant patients. In *Transplantation proceedings* 2007; 39(7): 2242-2244.
- 103) Kniepeiss D, Iberer F, Schaffellner S, et al. Dyslipidemia during sirolimus therapy in patients after liver transplantation. *Clinical transplantation* 2004; 18(6): 642-646.
- 104) Ponticelli C, Passerini P. Gastrointestinal complications in renal transplant recipients. *Transplant international* 2005; 18(6): 643-650.
- 105) Dittrich E, Schmaldienst S, Soleiman A, et al. Rapamycin-associated post-transplantation glomerulonephritis and its remission after reintroduction of calcineurin-inhibitor therapy. *Transplant international* 2004; 17(4): 215-220.
- 106) Straathof-Galema L, Wetzels J, Dijkman H, et al. Sirolimus-associated heavy proteinuria in a renal transplant recipient: evidence for a tubular mechanism. *Am J Transplant* 2006; 6: 429-433.
- 107) Pinheiro H, Amaro T, Braga A, et al. Post-rapamycin proteinuria: incidence, evolution, and therapeutic handling at a single center. *Transplant Proc* 2006; 38: 3476-3478.
- 108) Campistol JM, de Fijter JW, Flechner SM, et al. mTOR inhibitor-associated dermatologic and mucosal problems. *Clinical transplantation* 2010; 24(2): 149-156.
- 109) Kahan BD, Gibbons S, Tejpal N, et al. Synergistic interactions of cyclosporine and rapamycin to inhibit immune performances of normal human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Transplantation* 1991; 51:232-240.

- 110) Kaplan, B., Meier-Kriesche, H. U., Napoli, K. L., & Kahan, B. D. (1998). The effects of relative timing of sirolimus and cyclosporine microemulsion formulation coadministration on the pharmacokinetics of each agent. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 63(1), 48-53.
- 111) Morath C, Arns W, Schwenger V, et al. Sirolimus in renal transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2007; 22(suppl 8): 61-65.
- 112) Rangan GK, Nguyen T, Mainra R, et al. Therapeutic role of sirolimus in non-transplant kidney disease. *Pharmacology & therapeutics* 2009; 123(2): 187-206.
- 113) Yard BA, Pancham RR, Paape ME, et al. CsA, FK506, corticosteroids and rapamycin inhibit TNF alpha production by cultured PTEC. *Kidney Int* 1993; 44(2): 352-358.
- 114) Lock HR, Sacks SH, Robson M G. Rapamycin at subimmunosuppressive levels inhibits mesangial cell proliferation and extracellular matrix production. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(1): F76-81.
- 115) Lieberthal W, Fuhro R, Andry CC, et al. Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281(4): F693-706.
- 116) Vogetseder A, Picard N, Gaspert A, et al. Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294(1): C22-28.
- 117) Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006; 69(12): 2131-2147.
- 118) Huang S, Houghton PJ. Mechanisms of resistance to rapamycins. *Drug Resist Updat* 2001; 4(6): 378-391.

- 119) Chiang GG, Abraham RT. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med* 2007; 13(10): 433–442.
- 120) Bansbach CC, Wancio D, Caccese RG, et al. Rapamycin's inhibition of thymocyte proliferation, unlike that of cyclosporin A or prednisolone, is not associated with cytotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 685: 114–116.
- 121) Gadir N, Jackson DN, Lee E, et al. Defective TGF-beta signalling sensitizes human cancer cells to rapamycin. *Oncogene* 2008; 27(8): 1055–1062.
- 122) Anglicheau D, Pallet N, Rabant M, et al. Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine–sirolimus interaction. *Kidney Int* 2006; 70(6): 1019–1025.
- 123) Shen C, Lancaster CS, Shi B, et al. TOR signaling is a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 2007; 27(20): 7007–7017.
- 124) 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): 326–333.
- 125) Di Joseph JF, Mihatsch MJ., Sehgal, SN. Influence of rat strain on rapamycin's kidney effects. *Transplant Proc* 1993; 25(1 Pt 1): 714–715.
- 126) Golbaekdal K, Nielsen CB, Djurhuus JC, et al. Effects of rapamycin on renal hemodynamics, water and sodium excretion, and plasma levels of angiotensin II, aldosterone, atrial natriuretic peptide, and vasopressin in pigs. *Transplantation* 1994; 58(11): 1153–1157.
- 127) Nielsen FT, Starklint H, Dieperink H. Impaired glomerular and tubular function as a short-term effect of sirolimus treatment in the rat. *Am J Nephrol* 2005; 25(4): 411–416.

- 128) Sabbatini M, Sansone G, Uccello F, et al. Acute effects of rapamycin on glomerular dynamics: A micropuncture study in the rat. *Transplantation* 2000; 69(9): 1946–1990.
- 129) Morales J, Andrés A, Dominguez-Gil B, et al. Tubular function in patients with hypokalemia induced by sirolimus after renal transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35: 154S-156S.
- 130) Boletta A, Germino GG. Role of polycystins in renal tubulogenesis. *Trends Cell Biol* 2003; 13(9): 484–492.
- 131) Nijland MJ, Schlabritz-Loutsevitch NE, Hubbard GB, Non-human primate fetal kidney transcriptome analysis indicates mammalian target of rapamycin (mTOR) is a central nutrient-responsive pathway. *J Physiol* 2007; 579(Pt 3): 643–656.
- 132) Han HJ, Sigurdson WJ, Nickerson PA, et al. Both mitogen activated protein kinase and the mammalian target of rapamycin modulate the development of functional renal proximal tubules in matrigel. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 9): 1821–1833.
- 133) Reitamo S, Spuls P, Sassolas B. et al. Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: A randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 2001; 145(3): 438–445.
- 134) Kamar N, Allard J, Ribes D, et al. Assessment of glomerular and tubular functions in renal transplant patients receiving cyclosporine A in combination with either sirolimus or everolimus. *Clin Nephrol* 2005; 63(2): 80–86.
- 135) Ribes D, Kamar N, Esposito L, et al. Combined use of tacrolimus and sirolimus in de novo renal transplant patients: current data. *Transplant Proc* 2005; 37(6): 2813–2816.

- 136) Podder H, Stepkowski SM, Napoli KL, et al. Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(5): 1059–1071.
- 137) Park SI, Felipe CR, Pinheiro-Machado PG, et al. Tacrolimus pharmacokinetic drug interactions: Effect of prednisone, mycophenolic acid or sirolimus. *Fundam Clin Pharmacol* 2009; 23(1): 137–145.
- 138) Marti HP, Frey F.J. Nephrotoxicity of rapamycin: an emerging problem in clinical medicine. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(1): 13–15.
- 139) Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2007; 369(9569): 1287–1301.
- 140) Shillingford JM, Murcia NS, Larson, CH, et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(14): 5466–5471.
- 141) Serra A, Poster D, Kistler A, et al. Sirolimus and Kidney Growth in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* 2010.
- 142) Tao Y, Kim J, Schrier RW, et al. Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(1): 46–51.
- 143) Wahl PR, Serra AL, Le Hir M, et al. Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han:SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(3): 598–604.
- 144) Berthier CC, Wahl PR, Le Hir M, et al. Sirolimus ameliorates the enhanced expression of metalloproteinases in a rat model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(3): 880–889.

- 145) Zafar I, Edelstein CL. Sirolimus treatment in the female Han:Sprd (Cy/+) rat model of PKD. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 131-139.
- 146) Qian Q, Du H, King BF, et al. Sirolimus reduces polycystic liver volume in ADPKD patients. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19(3): 631–638.
- 147) Le Tourneau C, Faivre S, Serova M, et al. mTORC1 inhibitors: is temsirolimus in renal cancer telling us how they really work? *Br J Cancer* 2008; 99(8): 1197–1203.
- 148) Luan FL, Hojo M, Maluccio M, et al. Rapamycin blocks tumor progression: Unlinking immunosuppression from antitumor efficacy. *Transplantation* 2002; 73(10): 1565–1572.
- 149) Hudes G, Carducci M, Tomczak, P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356(22): 2271–2281.
- 150) Henske EP. Tuberous sclerosis and the kidney: From mesenchyme to epithelium, and beyond. *Pediatr Nephrol* 2005; 20(7): 854–857.
- 151) Kenerson HL, Aicher LD, True LD, et al : Activated mammalian target of rapamycin pathway in the pathogenesis of tuberous sclerosis complex renal tumors. *Cancer Res* 2002; 62(20): 5645–5650.
- 152) Bissler JJ, Kingswood JC, Radzikowska E, Zonnenberg BA, Frost M, Belousova E, Sauter M, Nonomura N, Brakemeier S, de Vries PJ, Whittemore VH, Chen D, Sahmoud T, Shah G, Lincy J, Lebowl D, Budde K. Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangiomyomatosis (EXIST-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2013 Mar 9;381(9869):817-24
- 153) El-Hashemite N, Zhang H, Henske EP, et al. Mutation in TSC2 and activation of mammalian target of rapamycin signalling pathway in renal angiomyolipoma. *Lancet* 2003; 361(9366): 1348–1349.



- 154) Lieberthal W, Fuhro R, Andry CC, et al. Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281(4): F693–706.
- 155) Goncalves GM, Cenedeze MA, Feitoza CQ., et al. The role of heme oxygenase 1 in rapamycin-induced renal dysfunction after ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int* 2006; 70(10): 1742–1749.
- 156) Rama I, Bruene B, Torras J, et al. Hypoxia stimulus: An adaptive immune response during dendritic cell maturation. *Kidney Int* 2008; 73(7): 816–825.
- 157) Inman SR, Davis NA, Olson KM, et al. Rapamycin preserves renal function compared with cyclosporine A after ischemia/reperfusion injury. *Urology* 2003; 62(4): 750–754.
- 158) Yang B, Jain S, Pawluczyk IZ, et al. Inflammation and caspase activation in long-term renal ischemia/reperfusion injury and immunosuppression in rats. *Kidney Int* 2005; 68(5): 2050–2067.
- 159) Bohmova R, Honsova E, Heemann U, , et al. Effect of sirolimus on ischemia/reperfusion injury in transgenic hypertensive rat. *Transplant Proc* 2002; 34(8): 3051–3052.
- 160) Smith KD, Wrenshall LE, Nicosia RF, et al. Delayed graft function and cast nephropathy associated with tacrolimus plus rapamycin use. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(4): 1037–1045.
- 161) Loverre A, Ditunno P, Crovace A, et al. Ischemia–reperfusion induces glomerular and tubular activation of proinflammatory and antiapoptotic pathways: differential modulation by rapamycin. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(10): 2675–2686.

- 162) Straathof-Galema L, Wetzels JF, Dijkman HB, et al. Sirolimus-associated heavy proteinuria in a renal transplant recipient: Evidence for a tubular mechanism. *Am J Transplant* 2006; 6(2): 429–433.
- 163) Kettritz R. Autoimmunity in kidney diseases. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2008; 241: 99–103.
- 164) Marshall CB, Shankland SJ. Cell cycle and glomerular disease: a minireview. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 102(2): e39–48.
- 165) Barber DF, Bartolome A, Hernandez C, et al. PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med* 2005; 11(9): 933–935.
- 166) Cavallo T. Membranous nephropathy. Insights from Heymann nephritis. *Am J Pathol* 1994; 144(4): 651–658.
- 167) Bonegio RG, Fuhro R, Wang Z, et al. Rapamycin ameliorates proteinuria-associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in experimental membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005; 16(7): 2063-2072.
- 168) Naumovic R, Jovovic D, Basta-Jovanovic G, et al. Effects of rapamycin on active Heymann nephritis. *Am J Nephrol* 2007; 27(4): 379–389.
- 169) Coombes JD, Mreich E, Liddle C, et al. Rapamycin worsens renal function and intratubular cast formation in protein overload nephropathy. *Kidney Int* 2005; 68(6): 2599–2607.
- 170) Mreich E, Coombes JD, Rangan GK. Sirolimus does not reduce receptor-mediated endocytosis of albumin in proximal tubule cells. *Transplantation* 2007; 83(1): 105–107.
- 171) Couser WG. Glomerulonephritis. *Lancet* 1999; 353(9163): 1509–1515.

- 172) Daniel C, Renders L, Amann K, et al. Mechanisms of everolimus-induced glomerulosclerosis after glomerular injury in the rat. *Am J Transplant* 2005; 5(12): 2849–2861.
- 173) Kramer S, Wang-Rosenke Y, Scholl V, et al. Low-dose mTOR inhibition by rapamycin attenuates progression in anti-thy1- induced chronic glomerulosclerosis of the rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(2): F440–449.
- 174) Keller K, Daniel C, Schocklmann H, et al. Everolimus inhibits glomerular endothelial cell proliferation and VEGF, but not long-term recovery in experimental thrombotic microangiopathy. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(10): 2724–2735.
- 175) Ramos-Barron A, Pinera-Haces C, Gomez-Alamillo C, et al. Prevention of murine lupus disease in (NZBxNZW) F1 mice by sirolimus treatment. *Lupus* 2007; 16(10): 775–781.
- 176) Ding M, Cui S, Li C, et al. Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat Med* 2006; 12(9): 1081–1087.
- 177) Brukamp K, Jim B, Moeller MJ et al. Hypoxia and podocyte-specific Vhlh deletion confer risk of glomerular disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293(4): F1397–1407.
- 178) Hohegger K, Jansky GL, Soleiman A, et al. Differential effects of rapamycin in anti-GBM glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19(8): 1520–1529.
- 179) Succar L, Lai-Kwon J, Nikolic-Paterson D, et al. Inhibition of mTOR reduces crescent formation and improves renal function in experimental crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 399A-354.
- 180) Baeder WL, Sredy J, Sehgal SN, et al. Rapamycin prevents the onset of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in NOD mice. *Clin Exp Immunol* 1992; 89(2): 174–178.

- 181) 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): 1395–1404.
- 182) Sataranatarajan K, Mariappan MM, Lee MJ, et al. Regulation of elongation phase of mRNA translation in diabetic nephropathy: Amelioration by rapamycin. *Am J Pathol* 2007; 171(6): 1733–1742.
- 183) Zdychová J, Kazdová L, Pelikanová T, et al. Renal activity of Akt kinase in obese Zucker rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233: 1231-1241.
- 184) Fervenza FC, Fitzpatrick PM, Mertz J, et al. Acute rapamycin nephrotoxicity in native kidneys of patients with chronic glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(5): 1288–1292.
- 185) Tumlin JA, Miller D, Near M, et al. A prospective, open-label trial of sirolimus in the treatment of focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1(1): 109–116.
- 186) Cho ME, Hurley JK, Kopp JB. Sirolimus therapy of focal segmental glomerulosclerosis is associated with nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis* 2007; 49(2): 310–317.
- 187) Patel P, Pal S, Ashley C, et al. Combination therapy with sirolimus (rapamycin) and tacrolimus (FK-506) in treatment of refractory minimal change nephropathy, a clinical case report. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(5): 985–987.
- 188) Davison R, Fenwick S. The combined use of sirolimus and cyclosporin in the management of refractory minimal change nephropathy: 'a novel use of sirolimus'. *NDT Plus* 2009; 2: 368-369.

- 189) Senior PA, Paty, BW, Cockfield SM, et al. Proteinuria developing after clinical islet transplantation resolves with sirolimus withdrawal and increased tacrolimus dosing. *Am J Transplant* 2005; 5(9): 2318–2323.
- 190) Nielsen F, Starklint H, Dieperink H. Impaired glomerular and tubular function as a short-term effect of sirolimus treatment in the rat. *Am J Nephrol* 2005; 25: 411-416.
- 191) Castro C, Campistol J, Sancho D, et al. Rapamycin attenuates atherosclerosis induced by dietary cholesterol in apolipoprotein-deficient mice through a p27 Kip1 - independent pathway. *Atherosclerosis* 2004; 172: 31-38.
- 192) Di Paolo S, Teutonico A, Leogrande D, et al. Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin signaling downregulates insulin receptor substrates 1 and 2 and AKT activation: A crossroad between cancer and diabetes? *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2236-2244.
- 193) Pavlakis M, Goldfarb-Rumyantzev A. Diabetes after transplantation and sirolimus: what's the connection? *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1255-1256.
- 194) Schieppati L, Mosconi A, Perna et al. Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 1993; 329(2): 85–89.
- 195) Ponticelli P, Zucchelli P, Passerini et al. A 10-year follow-up of a randomized study with methylprednisolone and chlorambucil in membranous nephropathy. *Kidney International* 1995; 48(5): 1600–1604.
- 196) Polanco N, Gutierrez E, Covars'I A, et al. Spontaneous remission of nephrotic syndrome in idiopathic membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2010; 24(4): 697–704.

- 197) Hogan SL, Muller KE, Jennette JC, et al. A review of therapeutic studies of idiopathic membranous glomerulopathy. *American Journal of Kidney Diseases* 1995; 25(6): 862–875.
- 198) Cattran DC, Pei Y., Greenwood CMT, et al. Validation of a predictive model of idiopathic membranous nephropathy: its clinical and research implications. *Kidney International* 1997; 51(3): 901–907.
- 199) Shiiki H, Saito T, Nishitani Y, et al., Prognosis and risk factors for idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome in Japan. *Kidney International* 2004; 65(4): 1400–1407.
- 200) Debiec H, Nauta J, Coulet F, et al. Role of truncating mutations in MME gene in fetomaternal alloimmunisation and antenatal glomerulopathies. *The Lancet* 2004; 364(9441): 1252–1259.
- 201) Debiec H, Lefeu, F, Kemper MJ, et al. Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin. *The New England Journal of Medicine* 2011; 364(22): 2101–2110.
- 202) Prunotto M., Carnevali ML, Candiano G, et al., Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2. *Journal of the American Society of Nephrology* 2010; 21(3): 507–519.
- 203) Ronco P, Debiec H. Antigen identification in membranous nephropathy moves toward targeted monitoring and new therapy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2010; 21(4): 564–569.
- 204) Ronco P, Debiec H. Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges. *Nature Reviews Nephrology* 2012; 8(4): 203–213.
- 205) Heymann W, Hackel DB, Harwood S, et al. Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1959; 100(4): 660–664.

- 206) Salant DJ, Quigg RJ, Cybulsky AV. Heymann nephritis: mechanisms of renal injury. *Kidney International* 1989; 35(4): 976–984.
- 207) Beck LH, Fervenza FC, Beck DM, et al. Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011; 22(8): 1543–1550.
- 208) Aagaard-Tillery KM, Jelinek DF. Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin. *Cellular Immunology* 1994; 156(2): 493–507.
- 209) Heidt S, Roelen DL, Eijssink C, et al. Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of mmf and rapamycin. *Transplantation* 2008; 86(9): 1292–1300.
- 210) Bonegio RGB, Fuhro R, Wang Z, et al. Rapamycin ameliorates proteinuria associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in experimental membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005; 16(7): 2063–2072.
- 211) Deegens JKL, Dijkman HBPM, Bormet GF, et al. Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International* 2008; 74(12): 1568–1576.
- 212) Rovira J, Arellano EM, Carreras J, et al. Mammalian target of rapamycin inhibition prevents glomerular hypertrophy in a model of renal mass reduction. *Transplantation* 2009; 88(5): 646–652.
- 213) Wu MJ, Wen MC, Chiu YT, et al. Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Kidney International* 2006; 69(11): 2029–2036.

- 214) Lloberas N, Cruzado JM, Franquesa M, et al. Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006; 17(5): 1395–1404.
- 215) Lui SL, Yung S, Tsang R, et al. Rapamycin prevents the development of nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice. *Lupus* 2008; 17(4): 305–313.
- 216) Lui SL, Tsang R, Chan KW, et al. Rapamycin attenuates the severity of established nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2008; 23(9): 2768–2776.
- 217) Stylianou K, Petrakis I, Mavroeidi V, et al. The PI3K/Akt/ mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2011; 26(2): 498–508.
- 218) Wittmann S, Daniel C, Braun A, et al. The mTOR inhibitor everolimus attenuates the time course of chronic anti-Thy1 nephritis in the rat. *Nephron* 2008; 108(2): e45–e56.
- 219) Vogelbacher R, Wittmann S, Braun A, et al. The mTOR inhibitor everolimus induces proteinuria and renal deterioration in the remnant kidney model in the rat. *Transplantation* 2007; 84(11): 1492–1499.
- 220) Daniel C, Ziswiler R, Frey B, et al. Proinflammatory effects in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis of the immunosuppressive agent SDZ RAD, a rapamycin derivative. *Experimental Nephrology* 2000; 8(1): 52–62.
- 221) Stylianou K, Petrakis I, Mavroeidi V, et al. Rapamycin induced ultrastructural and molecular alterations in glomerular podocytes in healthy mice. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012; 27(8): 3141–3148.
- 222) Torras J, Herrero-Fresneda I, Gulas O, et al. Rapamycin has dual opposing effects on proteinuric experimental nephropathies: is it a matter of podocyte damage. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2009; 24(12): 3632–3640.



- 223) Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, et al. Rapamycin promotes expansion of functional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *Journal of Immunology* 2006; 177(12): 8338–8347.
- 224) David Fernandez and Adras Perl. mTOR signaling:A central pathway to Pathogenesis in Systemic Lupus Erythematosus.*Discov. Med.*2010 March; 9(46): 173–178
- 225) Agnes B. Fogo. The targeted podocyte *J. Clin.Invest.* 2011; 121 (6) 2142-2145
- 226) Gearoid McMahon, Dipak Datta, Sarah Bruneau, Martin Kann, Myda Khalid, Jacqueline Ho, Tatsuichiro Seto, Jordan A. Kreidberg, Isaac E. Stillman, and David M. Briscoe . Constitutive activation of the mtor signaling pathway within the normal glomerulus *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Aug 24; 425(2): 244–249.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δημοσιεύονται στο Hindawi Publishing Corporation Clinical and Developmental Immunology με τίτλο δημοσίευσης:

**«Rapamycin Ameliorates Proteinuria and Restores Nephrin and Podocin Expression in Experimental Membranous Nephropathy»**

**Stavros Stratakis, Kostas Stylianou, Ioannis Petrakis, Vasiliki Mavroeiidi, Rafaela Poulidaki, Christina Petra<sup>1</sup> Demitrios Moisiadis<sup>1</sup> Spyros Stratigis, Eleftheria Vardaki, Lydia Nakopoulou, and Eugene Daphnis**

Hindawi Publishing Corporation Clinical and Developmental Immunology Volume 2013, Article ID 941893, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/941893>

Επίσης παρουσιάστηκε στο 16<sup>ο</sup> πανελλήνιο συνέδριο νεφρολογίας ως προφορική ανακοίνωση με τίτλο «Η Ραπαμυκίνη περιορίζει την πρωτεϊνουρία και αποκαθιστά την έκφραση των πρωτεϊνών του διαφράγματος της σχισμής διήθησης σε πειραματικό μοντέλο μεμβρανώδους σπειραματοπάθειας» και ως ποστερ με αριθμό στο παγκόσμιο συνέδριο νεφρολογίας στο Μιλάνο το 2009.

## Research Article

# Rapamycin Ameliorates Proteinuria and Restores Nephrin and Podocin Expression in Experimental Membranous Nephropathy

Stavros Stratakis,<sup>1</sup> Kostas Stylianou,<sup>1</sup> Ioannis Petrakis,<sup>1</sup> Vasiliki Mavroei,<sup>1</sup>  
Rafaela Poulidaki,<sup>1</sup> Christina Petra,<sup>1</sup> Demitrios Moisiadis,<sup>1</sup> Spyros Stratigis,<sup>1</sup>  
Eleftheria Vardaki,<sup>1</sup> Lydia Nakopoulou,<sup>2</sup> and Eugene Daphnis<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nephrology Department, Heraklion University Hospital, 71110 Heraklion, Greece

<sup>2</sup> Pathology Department, Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece

Correspondence should be addressed to Kostas Stylianou; [kstylianu@gmail.com](mailto:kstylianu@gmail.com)

Received 26 March 2013; Revised 28 July 2013; Accepted 1 August 2013

Academic Editor: Xuan Zhang

Copyright © 2013 Stavros Stratakis et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Objective.** Recent studies have shown a beneficial effect of rapamycin in passive and active Heymann Nephritis (HN). However, the mechanisms underlying this beneficial effect have not been elucidated. **Methods.** Passive Heymann Nephritis (PHN) was induced by a single intravenous infusion of anti-Fx1 in 12 Sprague-Dawley male rats. One week later, six of these rats were commenced on daily treatment with subcutaneous rapamycin 0.5 mgr/kg (PHN-Rapa). The remaining six rats were used as the proteinuric control group (PHN) while six more rats without PHN were given the rapamycin solvent and served as the healthy control group (HC). All rats were sacrificed at the end of the 7th week. **Results.** Rapamycin significantly reduced proteinuria during the autologous phase of PHN. Histological lesions were markedly improved by rapamycin. Immunofluorescence revealed attenuated deposits of autologous alloantibodies in treated rats. Untreated rats showed decreased glomerular content of both nephrin and podocin whereas rapamycin restored their expression. **Conclusions.** Rapamycin monotherapy significantly improves proteinuria and histological lesions in experimental membranous nephropathy. This beneficial effect may be mediated by inhibition of the alloimmune response during the autologous phase of PHN and by restoration of the normal expression of the podocyte proteins nephrin and podocin.

## 1. Introduction

Membranous nephropathy (MN) is a common cause of nephrotic syndrome (NS), accounting for approximately 20% of cases in Caucasians [1]. MN is characterized by thickening of the glomerular basement membrane (GBM) and deposition of immune complexes and complement on its subepithelial aspect.

Spontaneous complete or partial remission of proteinuria occurs in 5–32% and 25–40%, respectively, at five years [2–5]. The probability of end-stage renal disease (ESRD) in untreated patients is approximately 15% at five years, 35% at 10 years, and 40% at 15 years [2–4, 6]. Due to the relatively benign clinical course, immunosuppressive agents are considered only in patients at risk of progressive disease or with severe symptomatic NS [2, 7, 8].

Recent evidence suggests that the majority of patients with idiopathic MN have circulating antibodies against phospholipase A2 receptor (PLA2R), which is present on podocytes, as is megalin in rat models of MN [9]. Similarly, neutral endopeptidase has been found as the target antigen in newborns' podocytes with alloimmune neonatal membranous nephropathy [10] and cationic bovine serum albumin as a planted antigen in early childhood MN [11]. Additional circulating autoantibodies against human podocytic antigens have recently been described [12]. It is speculated that as a result of podocyte injury by complement, various intracellular proteins and cryptic epitopes may be exposed, thus inducing "a second wave of immunisation" [13, 14].

Heymann Nephritis is a faithful experimental model of the disease that has been extensively studied since first described by Heymann et al. in 1959 [15]. The active model

of HN is induced by immunization of Lewis rats with preparations of brush-border proteins. The passive model of HN (PHN) is induced by a single i.v. injection of heterologous anti-brush border antiserum (anti-Fx1A) that produces heterologous IgG subepithelial deposits within hours to days. Proteinuria occurs in almost all animals within five days. This “heterologous phase” is followed, two weeks later, by an “autologous phase” during which rat IgG antibodies are produced against the heterologous IgG. The autologous IgG alloantibodies are also deposited at the subepithelial space, inducing a further increase in proteinuria [16]. The second (autologous) phase of PHN mimics idiopathic MN because during the autologous phase there is production of autoantibodies (similar to human disease), against a planted exogenous antigen (similar to cationic bovine serum albumin in humans) but also against neoantigens that are exposed in the subepithelial space during the initial injury (again similar to the second wave of immunization that is believed to happen in human idiopathic MN).

Therefore it is the autologous phase of passive HN that shares the same pathophysiological mechanisms to those recently identified in idiopathic MN in humans.

To date the therapeutic approach has not changed substantially. The monthly alteration of cyclophosphamide or cyclosporine and corticosteroids remains the standard therapy for severe and persisting proteinuria. Given the significance of IgG antibodies in MN, strategies to target B lymphocytes and antibody formation may be effective in inducing remission of the NS [14]. Indeed there is recent evidence that anti-CD20 antibody administration can effectively treat patients with idiopathic MN [17, 18].

The immunosuppressive effect of rapamycin was first attributed to the inhibition of cytokine-induced proliferation and clonal expansion of T cells. More recently, it has become evident that rapamycin (in contrast to tacrolimus and cyclosporine) inhibits the proliferation of B cells [19] and restricts B cells capable of producing immunoglobulins [20].

Bonegio et al. demonstrated that low dose rapamycin ameliorated proteinuria in experimental PHN and limited tubulointerstitial inflammation and interstitial fibrosis in association with reduced expression of proinflammatory and profibrotic genes [21]. The beneficial effects of rapamycin have also been observed in active HN [22]. Here we tried to investigate more specific effects of rapamycin, beyond the known antifibrotic ones. In particular we examined the effect of rapamycin on podocytes architecture and slit diaphragm proteins, as well as on the deposition of pathogenic autoantibodies that coincides with the autologous phase of PHN.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Experimental Design.** Eighteen male Sprague-Dawley rats (Pasteur Institute, Athens, Greece) were used in this study. The experiment was carried out in accordance with current legislation on animal experiments in the European Union and approved by our institution's Safety and Ethics Committee for Animal Research. All animals were housed in a room with 12 h light/12 h dark cycle, constant temperature of 22°C, and had free access to standard diet and water. PHN

was induced in 12 rats by a single i.v. infusion of 0.5 mL sheep anti-Fx1 per 100 gr of body weight. Anti-Fx1 antiserum was kindly provided by Dr. Kerjaschki. Rats were anesthetized by intraperitoneal infusion of Ketamine 67 mg/kg and Xylazine 10 mg/kg.

One week after anti-Fx1 infusion all rats became proteinuric. Six of them were randomly selected to commence daily subcutaneous injections of rapamycin (Sigma, St Louis, MO, USA) at a dose of 0.5 mgr/kg (PHN-Rapa group). Another six rats with PHN were given subcutaneously only the rapamycin solvent (DMSO) and served as the passive HN proteinuric group (PHN group). The remaining six, age and weight matched healthy rats without PHN, received only DMSO and served as the healthy control group (HC group). Urine collections were performed weekly in metabolic cages (Tecniplast, Italy). Body weight was also determined weekly and rapamycin dose was adjusted accordingly. All animals were sacrificed 7 weeks after anti-Fx1 administration.

**2.2. Isolation of Glomeruli.** Glomeruli were isolated by differential sieving by utilizing sieves (Retsch, Haan, Germany) of different pore sizes: 150  $\mu\text{m}$ , 106  $\mu\text{m}$ , and 75  $\mu\text{m}$ . Isolated glomeruli were retained on the bottom screen of 75  $\mu\text{m}$  pore size. Purity of the glomerular isolate was estimated to be >95%. After several washings with PBS, glomeruli were collected and centrifuged for 4 min at 1200 r.p.m. The pellet was homogenized in RIPA-buffer containing protease inhibitors and was stored in  $-80^{\circ}\text{C}$  till analysis.

**2.3. Western Blot (WB) Analysis.** Kidney cortex tissue was homogenized in RIPA-buffer containing protease inhibitors (Roche Diagnostics, Hellas, SA). Forty  $\mu\text{g}$  of glomerular lysate was electrophorized per lane on 7.5% SDS-gels. The proteins were transferred electrophoretically on nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Germany). Membranes were blocked with 5% BSA (Sigma-Aldrich) in TBS-1X Tween-20 0.1% and incubated overnight at 4°C with guinea pig nephrin pAb (1:500) (Progen Biotechnik GmbH, Germany), rabbit podocin pAb (1:500) (Abcam, Cambridge, UK), and with mouse anti-actin mAb (1:3000) (C4; Chemicon International, Temecula, CA). Appropriate HRP-linked antibodies (Cell Signaling Technology) were applied for 60 minutes at room temperature. Signal was detected using appropriate chemiluminescence reagent (Amersham Biosciences, GE Healthcare, UK). Bands were normalized to actin expression. Image-J (NIH, MD, USA) densitometry analysis system was used for measurements.

**2.4. Real Time RT-PCR (qRT-PCR).** Renal tissue was homogenized in Trizol Reagent (Life Technologies; Gibco BRL, Paisley, UK). One  $\mu\text{g}$  of total RNA was reverse transcribed (Superscript-II; Gibco) and amplified by RT-PCR. Products were normalized according to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. Measurements were performed using the ABI-Prism 7000 System (Applied Biosystems; California, USA). iTaq SYBR-Green Supermix with ROX (Bio-Rad) was used for the reactions. Results were normalized to GAPDH and analysis was performed using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method. All samples were tested in duplicate.

TABLE 1: Clinical and biochemical characteristics of groups under study.

	Group			P		
	PHN	PHN-Rapa	HC	PHN versus PHN-Rapa	PHN versus HC	PHN-Rapa versus HC
Initial body weight (gr)	170 ± 2.8	169 ± 5.2	180 ± 2.1	0.9	0.12	0.1
Final body weight (gr)	335.7 ± 7.3	268.3 ± 12.1	432.5 ± 9.2	<0.001	<0.001	<0.001
Kidney mass (gr)	4.3 ± 0.3	2.8 ± 0.2	4.04 ± 0.02	0.001	0.47	0.009
Kidney mass over body weight	0.013 ± 0.0002	0.010 ± 0.0004	0.009 ± 0.0003	0.013	0.002	0.27
Serum creatinine (mg/dL)	0.30 ± 0.001	0.31 ± 0.03	0.40 ± 0.001	0.55	0.006	0.016
Serum total protein (mg/dL)	5.91 ± 0.14	6.33 ± 0.12	6.77 ± 0.075	0.032	0.001	0.04
Serum albumin (mg/dL)	2.8 ± 0.09	3.1 ± 0.1	3.6 ± 0.04	0.03	0.002	0.04
Serum cholesterol (mg/dL)	187.5 ± 21	313.3 ± 53	66 ± 5	0.03	0.05	0.001

**2.5. Microscopy Studies.** Left kidney sections were fixed in neutral formalin and examined by a renal pathologist (L. Nakopoulou) who was blinded to the group assignment.

For immunofluorescence (IF) studies left kidney sections were embedded in OCT compound (Sakura Finetek USA, Inc), snap frozen in liquid nitrogen, and stored in  $-80^{\circ}\text{C}$  until examination. Five-micrometer thick cryosections were incubated overnight with the same primary antibodies used in western blot. Dilution for nephrin was 1:250 and for podocin was 1:100. Secondary antibodies used included Alexa Fluor-488 conjugated goat anti-rabbit or anti-guinea pig or anti-rat IgG at 1/1000 (Molecular Probes, Inc). RNase (Sigma) diluted in BSA1% PBS Tween1X (1:500) was applied for 30 min and then samples were incubated with propidium iodide 1:1000 (Sigma) for 5 minutes. At least 30 glomeruli were examined per animal. The intensity of the fluorescence was scored on a scale of 0 to 3+, where 0 = absent, 1+ = mild, 2+ = moderate, and 3+ = strong staining.

For EM studies left kidney sections were processed as usual and examined under a transmission electron microscope (JEM100CX-II; JEOL Inc., Tokyo, Japan). Twenty random glomeruli were examined for each mouse. Microphotographs were analyzed using the Digital Micrograph software (Gatan GmbH, Munchen, Germany). The entire curved length of the GBM of all open capillary loops (loop length, LL) and the number of foot processes (FPN) overlying capillary loops were measured. The foot process width (FPW) in each loop was calculated using the formula:  $\text{FPW} = (\pi/4 \times \text{LL})/\text{FPN}$  [23]. The foot process density (FPD) in each loop was measured using the formula:  $\text{FPD} = \text{FPN}/\text{LL}$ .

**2.6. Measurement of Proteinuria, Serum Creatinine, and Rapamycin Levels.** Urinary protein concentration was determined with the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Serum creatinine levels were measured at sacrifice by an autoanalyzer (Olympus 600, Tokyo, Japan). Rapamycin blood levels were determined by EIA in whole blood (Imx Analyzer, Abbott Lab, USA).

**2.7. Statistical Analysis.** Analysis of variance (ANOVA) was performed to compare serum creatinine and IF scores between groups. Continuous variables are expressed as

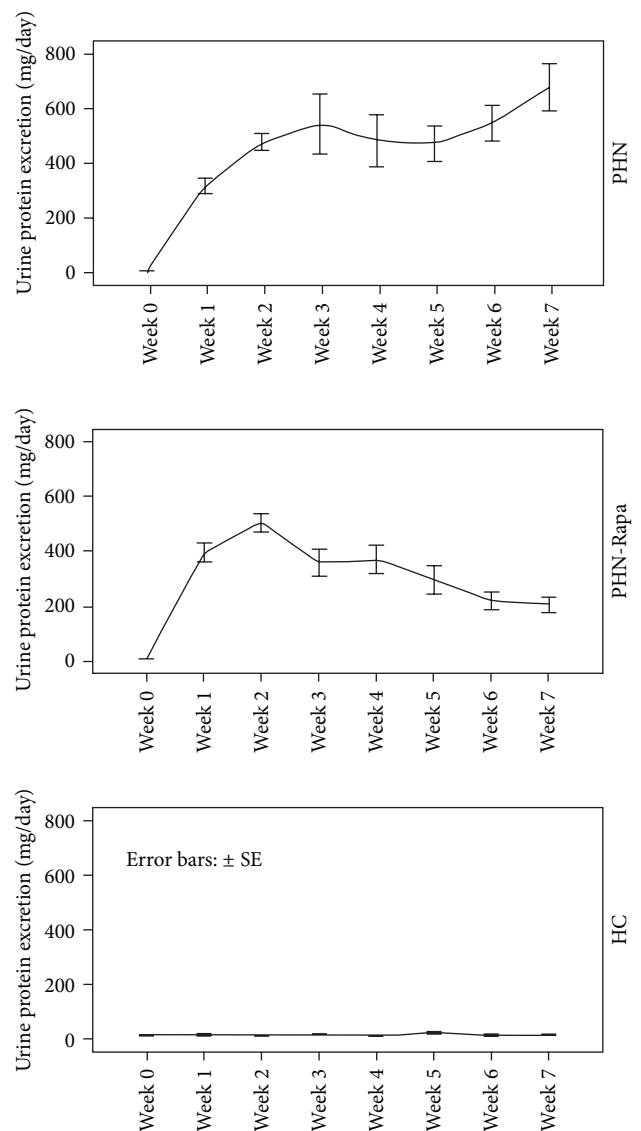


FIGURE 1: 24-hour urine protein excretion in study groups. Rapamycin was administered at week one in the PHN-Rapa group resulting in gradual amelioration of proteinuria in contrast to the PHN group in which proteinuria continued deteriorating.

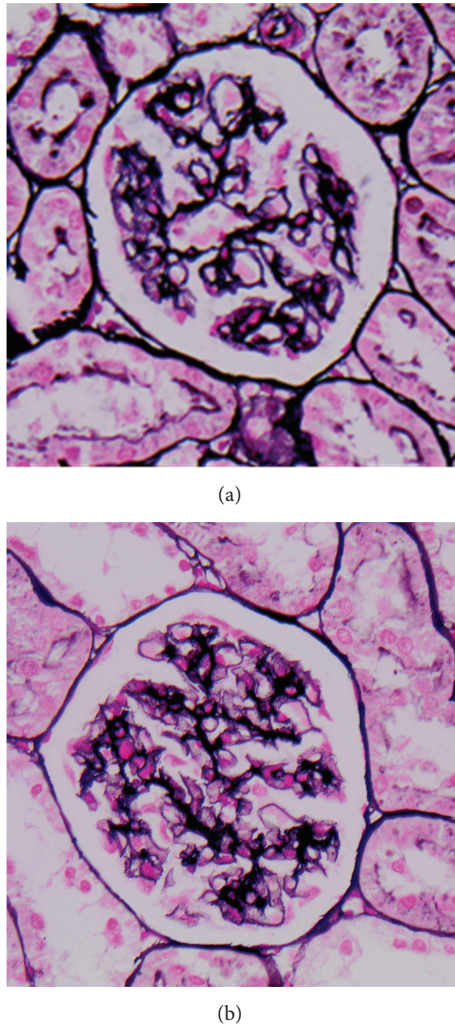


FIGURE 2: Photon microscopy. (a) Passive Heymann Nephritis. Moderate to severe irregular thickening of glomerular capillary basement membranes (Silver Methenamine,  $\times 400$ ). (b) Passive Heymann Nephritis after rapamycin administration. Mild to moderate thickening of glomerular capillary basement membranes (Silver Methenamine,  $\times 400$ ).

mean  $\pm$  SE. Repeated measures analysis of variance was used to compare the weekly measurements of proteinuria and body weight throughout the study. Independent samples Kruskal-Wallis and median tests were used for nonparametric comparisons. Differences were considered significant for a  $P$  less than 0.05 (two tailed). SPSS19-IBM software was used for statistical analysis.

### 3. Results

**3.1. Clinical and Biochemical Characteristics.** The 24-hour urinary protein of both PHN and PHN-Rapa groups increased at nephrotic levels at day 7 and remained so until the 2nd week after nephritis induction. Thereafter proteinuria began to decline in the PHN-Rapa group while it continued deteriorating in the PHN group. At the end of the study

(week 7) urine protein levels in the PHN-Rapa group were 1/3 of those in the PHN group ( $P = 0.007$ , by repeated measures ANOVA). Although proteinuria in the PHN-Rapa group declined continuously, it did not reach the urine protein levels of HCs at the time of sacrifice (Figure 1).

Rats in the PHN-Rapa group did not increase BW at the same pace as the other groups. At the end of the study their BW was 66% and 45% of that in the PHN and HC groups (Table 1). The ratio of renal to body mass at the end of the study was higher ( $P < 0.01$ ) in the PHN group (0.013) compared to PHN-Rapa group (0.010) and HC group (0.009). Serum creatinine, total protein, and total cholesterol are presented in Table 1. Serum creatinine levels were higher in the HC group due to the higher body weight in this group at the end of the study. Serum total protein and albumin levels in the PHN-Rapa group were significantly higher as compared to the PHN group but did not reach those of HCs (Table 1). The trough rapamycin levels averaged at  $12.5 \pm 0.76$  ng/mL in treated rats.

**3.2. Photon Microscopy, Immunofluorescence, and Electron Microscopy.** After staining with silver methenamine the glomeruli in the PHN group revealed moderate to severe thickening of the GBM, while rapamycin treated rats displayed less severe histological lesions with only mild or moderate thickening (Figure 2). Cryosections stained for anti-Rat IgG showed intense (3+) granular and irregular fluorescence along the glomerular capillary walls of the PHN group, whereas staining was attenuated (1+ to 2+) in the PHN-Rapa group and absent in the control group (Figure 3). Electron microscopy showed massive subepithelial deposits in almost all capillary loops in the PHN group with severely affected podocytes (Figure 4). In particular the harmonic mean and the median value of FPW were 830.78 nm and 789.26 nm, respectively, while the mean foot process density per  $\mu\text{m}$  of GBM length (FPD) was  $0.94 \pm 0.42$ . In the PHN-Rapa group the deposits and the podocytic injury were markedly attenuated compared to the PHN group (harmonic mean of FPW 613.3 nm, median 654.1 nm, and FPD  $1.28 \pm 0.9$ ; all  $P < 0.001$ ). Despite this improvement, the respective values in the HC were much lower (harmonic mean FPW 349 nm, median FPW 355 nm, and mean FPD  $2.24 \pm 0.43$ ; all  $P < 0.001$  as compared to other groups).

**3.3. Nephryn and Podocin Expression.** By WB the levels of nephryn and podocin protein levels in glomerular lysates were significantly lower (all  $P < 0.05$ ) in the PHN group as compared to the HC and PHN-Rapa groups. In the PHN-Rapa group, nephryn and podocin levels were similar to HCs (Figure 5).

By RT-PCR the expression of nephryn mRNA was lower in the PHN group compared to HC and PHN-Rapa groups ( $P = 0.011$  and  $P = 0.039$ , resp.; Figure 6). In contrast podocin mRNA was increased in the PHN and PHN-RAPA groups as compared to HCs (Figure 6).

Immunofluorescence for nephryn and podocin showed intense (3+) and regular linear staining in all examined glomeruli in the HC group. Normal staining for both proteins was also evident in the majority of glomeruli (72.8%) in the

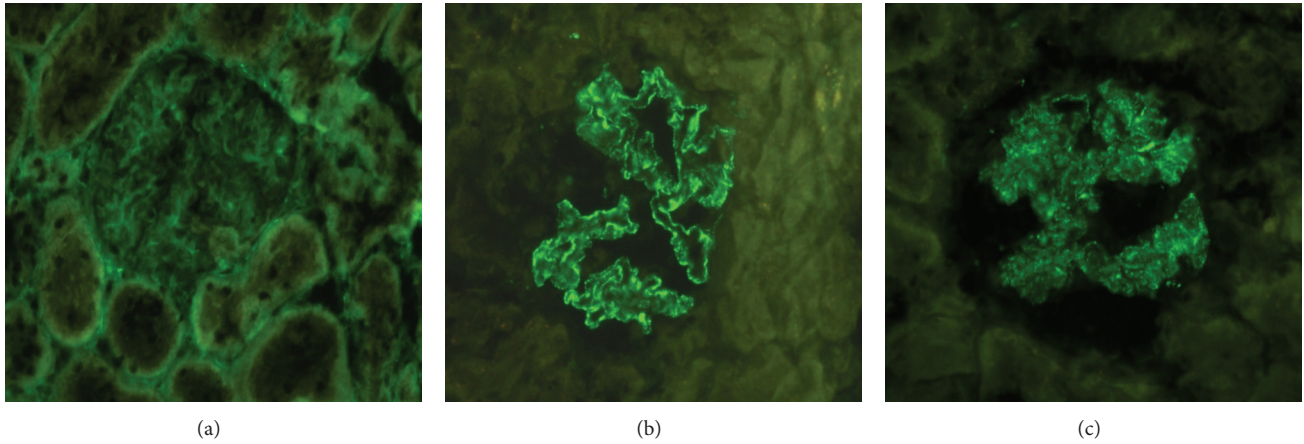


FIGURE 3: Immunofluorescence staining with anti-Rat IgG. (a) Healthy controls showed absence of staining. Original magnification  $\times 400$ . (b) Passive Heymann Nephritis; glomeruli showed intense (3+) granular and irregular fluorescence along the capillary walls ( $\times 400$ ). (c) Passive Heymann Nephritis after rapamycin administration; staining was significantly attenuated (1+ to 2+) in almost all glomeruli ( $\times 400$ ).

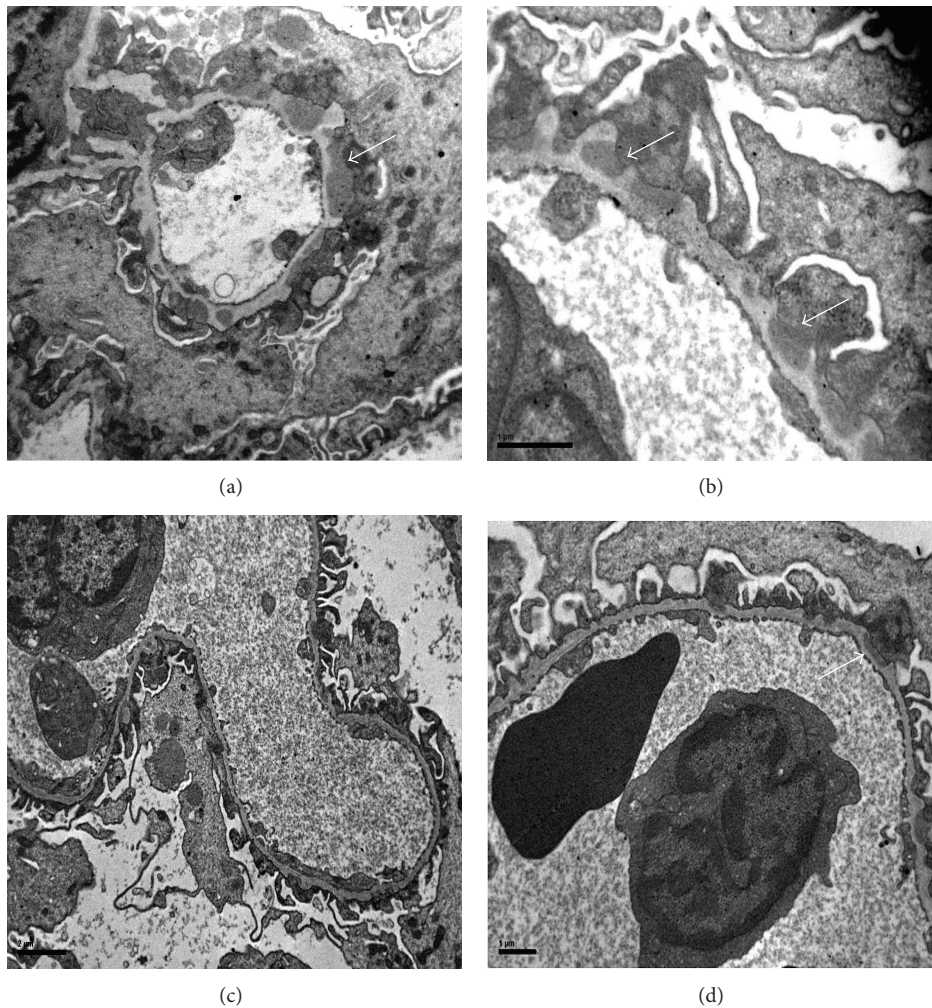


FIGURE 4: Electron microscopy. (a) Passive Heymann Nephritis. Massive subepithelial deposits (white arrow) with severe fusion of podocyte foot processes; original magnification  $\times 12$  k. (b) Passive Heymann Nephritis. Subepithelial deposits in higher magnification (white arrows); original magnification  $\times 26$  k. (c) Passive Heymann Nephritis after rapamycin administration. The deposits and the podocytic injury were attenuated compared to the PHN group; original magnification  $\times 8$  k. (d) Passive Heymann Nephritis after rapamycin administration (higher magnification  $\times 20$  k). Small subepithelial deposit (white arrow).



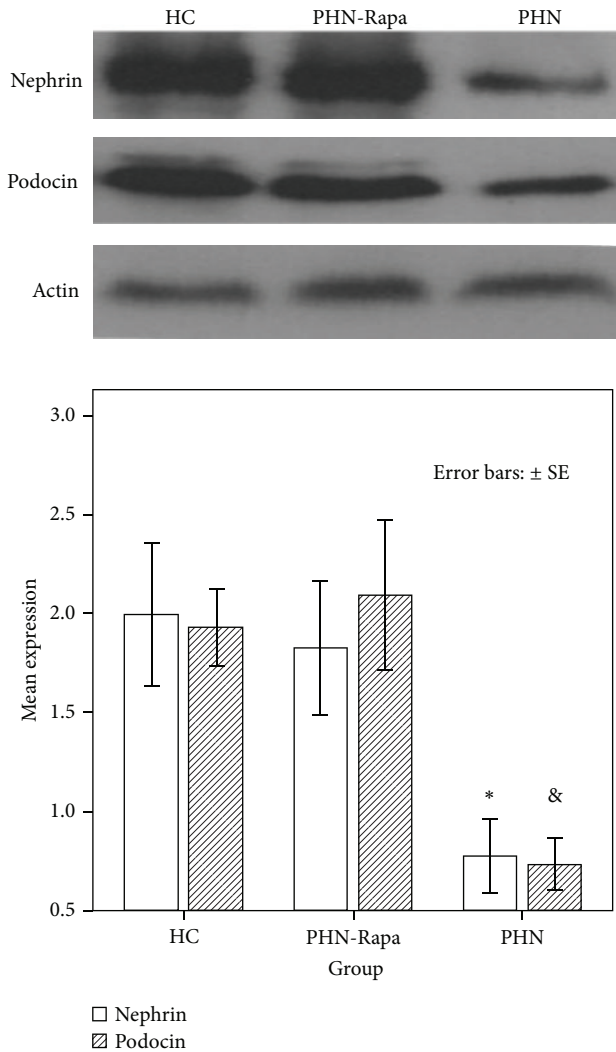


FIGURE 5: Western blot analysis for nephrin, podocin, and actin in glomerular lysates. HC: healthy controls; PHN: Passive Heymann Nephritis; PHN-Rapa: Passive Heymann Nephritis after rapamycin administration. Bars represent nephrin (white columns) and podocin (shaded columns) protein content corrected to actin concentration. \* $P = 0.01$ , & $P = 0.007$ . Error bars:  $\pm$ SE.

PHN-Rapa group. On the contrary, staining for nephrin and podocin was irregular and attenuated (<3+) in almost all glomeruli in the PHN group (Figure 7).

#### 4. Discussion

Rapamycin treatment has shown either protective [21, 22, 24–31] or untoward [32–36] results in various forms of experimental or human kidney disease. In summary, rapamycin displays dual opposing effects, with proteinuria and podocyte damage aggravation in the toxicimmunological glomerular models and a nephroprotective effect in the chronic inflammatory glomerulotubulointerstitial models [37]. Rapamycin inhibits the proliferation of both T and B cells [19] and reduces the number of B cells capable of producing immunoglobulins in contrast to cyclosporine and tacrolimus [20].

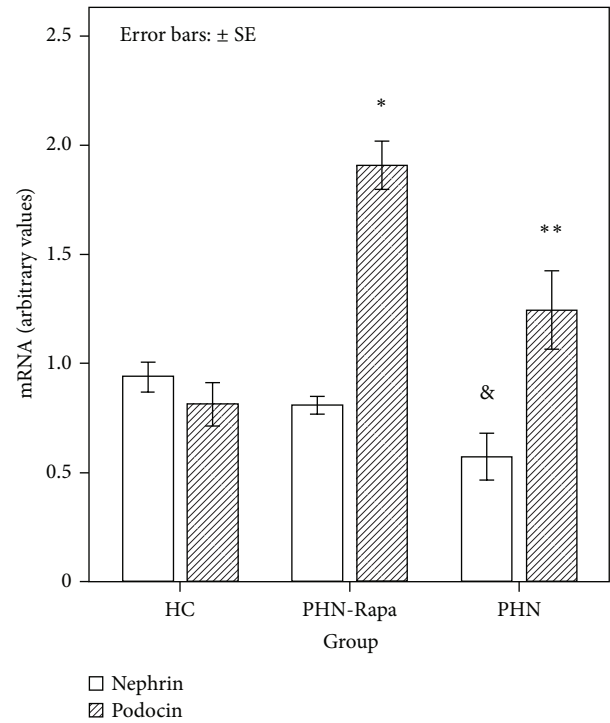


FIGURE 6: Real time PCR for nephrin and podocin mRNA in glomerular lysates. HC: healthy controls; PHN: Passive Heymann Nephritis; PHN-Rapa: Passive Heymann Nephritis after rapamycin administration. Bars represent nephrin mRNA (white columns) and podocin mRNA (shaded columns) corrected to GAPDH mRNA concentration. \* $P < 0.001$ , & $P = 0.011$ , \*\* $P = 0.038$ . Error bars:  $\pm$ SE.

Rapamycin can also promote the generation of regulatory T cells which suppress the immune system and control autoimmunity [38]. These combined properties make sirolimus an attractive agent for the treatment of autoimmune diseases such as MN.

In the present study rapamycin was given after induction of HN when severe proteinuria, and by inference histological lesions, had already been established. Nevertheless, rapamycin was able to abrogate the second rise of proteinuria during the autologous phase. This clinical result was escorted by significant alleviation of the histological lesions. More precise podocyte indices such as FPW and FPD were markedly improved by rapamycin whereas the expression of slit diaphragm proteins nephrin and podocin was almost completely restored. It is interesting that in the PHN group, podocin mRNA levels were increased, nephrin mRNA levels were decreased, and the respective protein levels were both decreased. This discrepancy implies that nephrin decreased owing to suppressed translation, whereas the decreased podocin levels may be due to loss or destruction of the protein with a compensatory increase in podocin mRNA levels. Residual histological lesions seen in the PHN-Rapa group should be attributed to the initial insult during the heterologous phase when the drug had not been given yet. The attenuation of anti-Rat IgG staining in IF indicates that rapamycin blocked the production of pathogenic autologous

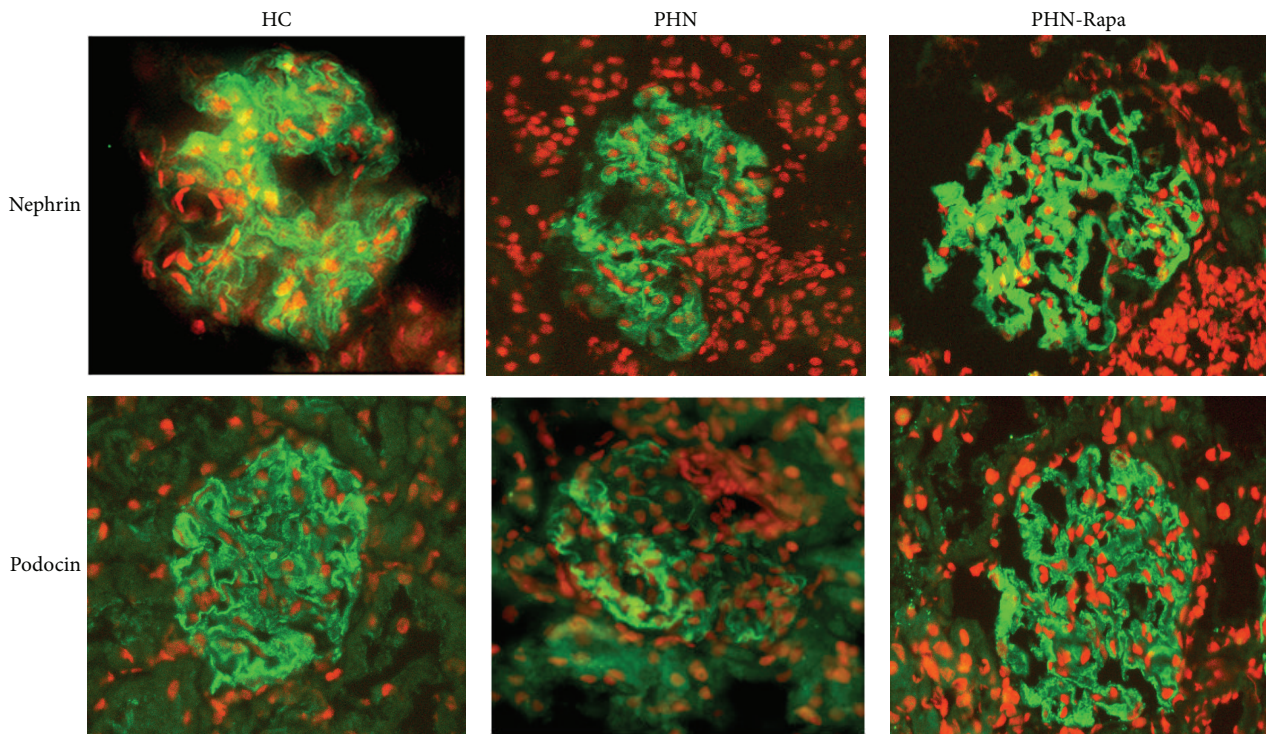


FIGURE 7: Immunofluorescence staining for nephrin and podocin. HC: healthy controls; PHN: Passive Heymann Nephritis; PHN-Rapa: Passive Heymann Nephritis after rapamycin administration. Nuclei have been stained with propidium iodide (red). Intense (3+) linear staining in the HC and PHN-Rapa groups in contrast to the PHN group which presented attenuated and irregular pattern of staining for both nephrin and podocin (middle panel).

alloantibodies (possibly via its B-cell inhibitory effects) that are responsible for the second boost of proteinuria, resulting thus in the gradual resolution of the NS. These results are in line with previous studies in animal models of MN [21, 22] and offer further insights into possible mechanisms for the therapeutic effect of rapamycin in experimental MN.

## 5. Conclusions

Rapamycin significantly improves proteinuria and histological lesions during the autologous phase of PHN, an effect that may be mediated by inhibition of the autoimmune response and by restoration of the normal expression of the podocyte proteins nephrin and podocin. If our results are confirmed by future studies, rapamycin may prove to be an effective treatment for MN.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

## Acknowledgment

This work was supported by the Secretariat of the Research Committee (Code 2976) of the University of Crete in Greece.

## References

- [1] C. Ponticelli, "Membranous nephropathy," *Journal of Nephrology*, vol. 20, no. 3, pp. 268–287, 2007.
- [2] A. Schieppati, L. Mosconi, A. Perna et al., "Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy," *The New England Journal of Medicine*, vol. 329, no. 2, pp. 85–89, 1993.
- [3] C. Ponticelli, P. Zucchelli, P. Passerini et al., "A 10-year follow-up of a randomized study with methylprednisolone and chlorambucil in membranous nephropathy," *Kidney International*, vol. 48, no. 5, pp. 1600–1604, 1995.
- [4] V. Jha, A. Ganguli, T. K. Saha et al., "A randomized, controlled trial of steroids and cyclophosphamide in adults with nephrotic syndrome caused by idiopathic membranous nephropathy," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 18, no. 6, pp. 1899–1904, 2007.
- [5] N. Polanco, E. Gutiérrez, A. Covarsí, F. Ariza, A. Carreño, A. Vigil et al., "Spontaneous remission of nephrotic syndrome in idiopathic membranous nephropathy," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 21, no. 4, pp. 697–704, 2010.
- [6] S. L. Hogan, K. E. Muller, J. C. Jennette, and R. J. Falk, "A review of therapeutic studies of idiopathic membranous glomerulopathy," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 25, no. 6, pp. 862–875, 1995.
- [7] D. C. Cattran, Y. Pei, C. M. T. Greenwood, C. Ponticelli, P. Passerini, and E. Honkanen, "Validation of a predictive model of idiopathic membranous nephropathy: its clinical and research implications," *Kidney International*, vol. 51, no. 3, pp. 901–907, 1997.
- [8] H. Shiiki, T. Saito, Y. Nishitani et al., "Prognosis and risk factors for idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome in Japan," *Kidney International*, vol. 65, no. 4, pp. 1400–1407, 2004.

- [9] L. H. Beck Jr., R. G. B. Bonegio, G. Lambeau et al., "M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy," *The New England Journal of Medicine*, vol. 361, no. 1, pp. 11–21, 2009.
- [10] H. Debiec, J. Nauta, F. Coulet et al., "Role of truncating mutations in MME gene in fetomaternal alloimmunisation and antenatal glomerulopathies," *The Lancet*, vol. 364, no. 9441, pp. 1252–1259, 2004.
- [11] H. Debiec, F. Lefeu, M. J. Kemper et al., "Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin," *The New England Journal of Medicine*, vol. 364, no. 22, pp. 2101–2110, 2011.
- [12] M. Prunotto, M. L. Carnevali, G. Candiano et al., "Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 21, no. 3, pp. 507–519, 2010.
- [13] P. Ronco and H. Debiec, "Antigen identification in membranous nephropathy moves toward targeted monitoring and new therapy," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 21, no. 4, pp. 564–569, 2010.
- [14] P. Ronco and H. Debiec, "Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges," *Nature Reviews Nephrology*, vol. 8, no. 4, pp. 203–213, 2012.
- [15] W. Heymann, D. B. Hackel, S. Harwood, S. G. Wilson, and J. L. Hunter, "Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 100, no. 4, pp. 660–664, 1959.
- [16] D. J. Salant, R. J. Quigg, and A. V. Cybulsky, "Heymann nephritis: mechanisms of renal injury," *Kidney International*, vol. 35, no. 4, pp. 976–984, 1989.
- [17] P. Ruggenenti, P. Cravedi, A. Chianca, A. Perna, B. Ruggiero, F. Gaspari et al., "Rituximab in idiopathic membranous nephropathy," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 23, no. 8, pp. 1416–1425, 2012.
- [18] L. H. Beck Jr., F. C. Fervenza, D. M. Beck et al., "Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 22, no. 8, pp. 1543–1550, 2011.
- [19] K. M. Aagaard-Tillery and D. F. Jelinek, "Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin," *Cellular Immunology*, vol. 156, no. 2, pp. 493–507, 1994.
- [20] S. Heidt, D. L. Roelen, C. Eijnsink, C. Van Kooten, F. H. J. Claas, and A. Mulder, "Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of mmf and rapamycin," *Transplantation*, vol. 86, no. 9, pp. 1292–1300, 2008.
- [21] R. G. B. Bonegio, R. Fuhro, Z. Wang et al., "Rapamycin ameliorates proteinuria-associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in experimental membranous nephropathy," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 16, no. 7, pp. 2063–2072, 2005.
- [22] R. Naumovic, D. Jovic, G. Basta-Jovanovic et al., "Effects of rapamycin on active Heymann nephritis," *American Journal of Nephrology*, vol. 27, no. 4, pp. 379–389, 2007.
- [23] J. K. J. Deegens, H. B. P. M. Dijkman, G. F. Borm et al., "Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis," *Kidney International*, vol. 74, no. 12, pp. 1568–1576, 2008.
- [24] J. Rovira, E. M. Arellano, J. Carreras et al., "Mammalian target of rapamycin inhibition prevents glomerular hypertrophy in a model of renal mass reduction," *Transplantation*, vol. 88, no. 5, pp. 646–652, 2009.
- [25] M.-J. Wu, M.-C. Wen, Y.-T. Chiu, Y.-Y. Chiou, K.-H. Shu, and M.-J. Tang, "Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis," *Kidney International*, vol. 69, no. 11, pp. 2029–2036, 2006.
- [26] N. Lloberas, J. M. Cruzado, M. Franquesa et al., "Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, no. 5, pp. 1395–1404, 2006.
- [27] S. L. Lui, S. Yung, R. Tsang et al., "Rapamycin prevents the development of nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice," *Lupus*, vol. 17, no. 4, pp. 305–313, 2008.
- [28] S. L. Lui, R. Tsang, K. W. Chan et al., "Rapamycin attenuates the severity of established nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 23, no. 9, pp. 2768–2776, 2008.
- [29] K. Stylianou, I. Petrakis, V. Mavroei et al., "The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 26, no. 2, pp. 498–508, 2011.
- [30] S. Krämer, Y. Wang-Rosenke, V. Scholl et al., "Low-dose mTOR inhibition by rapamycin attenuates progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis of the rat," *American Journal of Physiology*, vol. 294, no. 2, pp. F440–F449, 2008.
- [31] S. Wittmann, C. Daniel, A. Braun et al., "The mTOR inhibitor everolimus attenuates the time course of chronic anti-Thy1 nephritis in the rat," *Nephron*, vol. 108, no. 2, pp. e45–e56, 2008.
- [32] R. Vogelbacher, S. Wittmann, A. Braun, C. Daniel, and C. Hugo, "The mTOR inhibitor everolimus induces proteinuria and renal deterioration in the remnant kidney model in the rat," *Transplantation*, vol. 84, no. 11, pp. 1492–1499, 2007.
- [33] C. Daniel, R. Ziswiler, B. Frey, M. Pfister, and H.-P. Marti, "Proinflammatory effects in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis of the immunosuppressive agent SDZ RAD, a rapamycin derivative," *Experimental Nephrology*, vol. 8, no. 1, pp. 52–62, 2000.
- [34] C. Daniel, L. Renders, K. Amann, E. Schulze-Lohoff, I. A. Hauser, and C. Hugo, "Mechanisms of everolimus-induced glomerulosclerosis after glomerular injury in the rat," *American Journal of Transplantation*, vol. 5, no. 12, pp. 2849–2861, 2005.
- [35] F. C. Fervenza, P. M. Fitzpatrick, J. Mertz et al., "Acute rapamycin nephrotoxicity in native kidneys of patients with chronic glomerulopathies," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 19, no. 5, pp. 1288–1292, 2004.
- [36] K. Stylianou, I. Petrakis, V. Mavroei, S. Stratakis, G. Kokologianakis, E. Lioudaki et al., "Rapamycin induced ultrastructural and molecular alterations in glomerular podocytes in healthy mice," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 27, no. 8, pp. 3141–3148, 2012.
- [37] J. Torras, I. Herrero-Fresneda, O. Gulias et al., "Rapamycin has dual opposing effects on proteinuric experimental nephropathies: is it a matter of podocyte damage," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 24, no. 12, pp. 3632–3640, 2009.
- [38] M. Battaglia, A. Stabilini, B. Migliavacca, J. Horejs-Hoeck, T. Kaupper, and M.-G. Roncarolo, "Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients," *Journal of Immunology*, vol. 177, no. 12, pp. 8338–8347, 2006.



**Hindawi**  
Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>



# RAPAMYCIN AMELIORATES PROTEINURIA AND ALTERS SLIT DIAPHRAGM PROTEINS EXPRESSION IN PASSIVE HEYMANN NEPHRITIS

Stavros Stratakis, Kostas Stylianou, Ioannis Petrakis, Christina Kastrinaki, Garyfalia Perysinaki, Dimitrios Moisiades, Vasiliki Mavroeidi, Andrew Passam, Kostas Perakis and Eugene Daphnis.  
Nephrology, Heraklion University Hospital, Crete, Greece.

**INTRODUCTION AND AIMS:** Recent studies have shown a beneficial effect of rapamycin (rapa) in ameliorating proteinuria and histopathological lesions in either passive or active Heymann nephritis. The effect of rapa on the expression of the slit diaphragm proteins, nephrin and podocin has not been studied in experimental models of membranous nephropathy (MN) so far.

**METHODS:** Passive Heymann Nephritis (PHN) was induced by a single i.v infusion of 0.5ml anti-Fx1 per 100gr of body weight, in 12 Sprague-Dawley male rats. One week later, six of these rats were commenced on daily treatment with subcutaneous Rapa in a dose of 1.5 mgr/Kg (R-group). The remaining six rats with PHN were used as the proteinuric control group (H-group) while six more rats without PHN were used as the healthy control group (C-group). Over the following 7 weeks, weekly 24-hours urine collections were made and the animals were sacrificed at the end of the 7th week. Renal tissue was processed for photon and electron microscopy studies as well as for Western Blot analysis of the slit diaphragm proteins podocin and nephrin.

**RESULTS:** Rapamycin significantly reduced proteinuria (fig 1) in the R-group as compared to the untreated proteinuric animals (H-group). At the end of follow-up urine protein levels in the R-group were 1/3 of those in the P-group, approaching the urine protein levels of the healthy controls (C-group).

Untreated animals showed decrease in the protein content of both nephrin and podocin in glomerular lysates while Rapa restored the expression of both nephrin and podocin in the treated animals (fig 2).

Histological lesions were markedly attenuated in the R group (fig 3) in photon and electron microscopy as compared to H group (fig 4).

**CONCLUSIONS:** Rapamycin monotherapy significantly improves proteinuria and histologic lesions in experimental MN. This anti-proteinuric effect may be mediated by restoration of the normal expression of the podocyte specific proteins nephrin and podocin.

**REFERENCES:** Bonegio RGB. Rapamycin ameliorates proteinuria-associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16: 2063–2072, 2005

