ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF CRETE

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
FACULTY OF MEDICINE

Τ.Θ. 2208, 71003 Ηράκλειο, Κρήτη

P.O Box 2208, Heraklion, Crete, Greece

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:

Η ΧΡΗΣΗ ΠΟΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ

ΕΙΡΗΝΗ ΛΙΟΥΔΑΚΗ

Ηράκλειο 2015

ΗΜΕΡΟΜΗΝΊΑ ΕΝΑΡΞΗΣ:	09/06/2010
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:	Εμμαν. Γανωτάκης, Καθηγητής Παθολογίας
ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ 1:	Ευγ. Δαφνής, Αναπ. Καθηγητής Νεφρολογίας
ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ 2:	Γεώργ. Τζανακάκης, Καθηγητής Ανατομίας-Ιστολογίας

Το παρόν αφιερώνεται στη Μαρίκα και το Στράτο.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί αντικείμενο έμπνευσης του καθηγητή Παθολογίας κου. Εμμ. Σ. Γανωτάκη. Κατά την δειλή πρώτη προσπάθεια ενασχόλησης μου με την ερευνητική ιατρική, ο κος Γανωτάκης ορμώμενος από τη σύγχρονη τότε (2010) βιβλιογραφία, μου πρότεινε το παρόν θέμα. Με στόχο να βρω ένα αντικείμενο έρευνας το οποίο θα με ενέπνεε να εργαστώ σκληρά καθημερινά και όχι απλά να διεκπεραιώσω ένα ερευνητικό πρωτόκολλο, το εν λόγω θέμα δηλ, η μελέτη της παρουσίας ποδοκυττάρων ή τμημάτων αυτών στα ούρα ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη πριν την εκδήλωση νεφρικής νόσου κίνησε το ενδιαφέρον μου και πολλαπλά ερωτήματα γεννήθηκαν. Για αυτό το λόγο καθώς και για την αδιάκοπη στήριξη του όλα αυτά τα χρόνια από την αποφοίτηση μου έως και σήμερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κο. Γανωτάκη.

Ωστόσο, τίποτα δε θα μπορούσε να υλοποιηθεί χωρίς την ομάδα της Νεφρολογικής κλινικής και εργαστηρίου που με επικεφαλής τον αναπληρωτή καθηγητή Νεφρολογίας κο. Δαφνή, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά, αγκάλιασε την ιδέα και βοήθησε να πάρει σάρκα και οστά. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Κώστα Στυλιανού, Επιμελητή Νεφρολογίας, που στάθηκε ακούραστος καθοδηγητής, βοηθός και φίλος σε όλα τα βήματα αυτής της προσπάθειας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της "οικογένειας" της Νεφρολογικής, το φίλο και συνάδελφο κο. Ιωάννη Πετράκη καθώς και όλους τους επιμελητές της Νεφρολογικής κλινικής, κα. Ελευθερία Βαρδάκη, κο. Κώστα Περάκη και κο. Σπύρο Στρατήγη. Εξίσου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιμελητές της Παθολογικής κ. Ιωάννη Παπαδάκη και Γεώργιο Βρέντζο και την επιμελήτρια Παθολόγο ΤΕΠ κα. Μαρία Παντερή που με βοήθησαν ιδιαιτέρως στη στρατολόγηση των μαρτύρων αυτής της μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την κα. Χριστιάννα Χουλάκη από το εργαστήριο

Ρευματολογίας, της οποίας η συμβολή ήταν κρίσιμη εκπαιδεύοντας με στην τεχνική της real-time PCR, στην οποία και βασίστηκε η παραπάνω μελέτη. Επιπλέον, και ακόμα και αν αυτό το μήνυμα δε φτάσει ποτέ σε αυτούς, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ασθενείς του Μεταβολικού ιατρείου που δέχθηκαν να συμμετάσχουν σε αυτή τη μελέτη καθώς και την ομάδα ελέγχου, χωρίς τη συνεργασία των οποίων τίποτα δε θα ήταν δυνατό.

Τέλος, να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους γονείς μου Λεωνίδα και Καίτη και την αδερφή μου Στέλλα, που είναι πάντα εκεί για μένα.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΙΡΗΝΗ ΛΙΟΥΔΑΚΗ

Ιατρός

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Διεύθυνση κατοικίας:	Flat 12, 70-72 Westbourne Terrace, W2 6QA, London
Τηλέφωνο:	2810255448, +306976769821, +447517315823
Ηλεκτρονική Διεύθυνση:	lioudaki_irini@yahoo.gr
Ημερομηνία γέννησης:	20 Απριλίου 1984

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

06/2010 – 11/2015	Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στον τομέα της Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
09/2011 – 12/2011	Μετεκπαιδευτικό πρόγραμμα ιατρών – κλινική άσκηση
10/2002 - 07/2008	Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Βαθμός πτυχίου 8,84 (άριστα), 1η σε βαθμολογική σειρά αποφοιτήσασα για το ακαδημαϊκό έτος 2007-2008.
08/2006	Κλινική άσκηση στην Στεφανιαία Μονάδα, Boston University Medical School, Boston Medical Center.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ-ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

08/ 2015 - παρόν	Senior Clinical Fellow in Renal Medicine. King's College Hospital, Denmark Hill, London
05/ 2014 - 07/2015	Junior Clinical Fellow in Acute and General Medicine, King's College Hospital, Denmark Hill, London
02/2012 – 05/2012	Ειδικευόμενη παθολογίας, Παθολογική κλινική Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου.
01/2012 - 02/2012	Εκπαιδευόμενη ιατρός στη μονάδα εντατικής θεραπείας του Διαγνωστικού και Θεραπευτικού κέντρου «Υγεία»
09/2011 – 12/2011	Μεταπτυχιακή υπότροφος στο μετεκπαιδευτικό πρόγραμμα του Διαγνωστικού και Θεραπευτικού κέντρου «Υγεία»
05/2010 – 80/2011	Επιστημονικός και Κλινικός συνεργάτης στο Αθηρωματικό, Μεταβολικό και ιατρείο Παχυσαρκίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου.
02/2011 – 06/2011	Εκπαιδεύτρια στο τμήμα «Βοηθός φυσικοθεραπευτή – Υπάλληλος Εργαστηρίου Φυσικοθεραπείας», 2^{ο} ΙΕΚ Ηρακλείου.
11/2009 – 04/2010	Honorary Clinical and Research Fellow, Department of Clinical Biochemistry (Vascular Disease Prevention Clinics), Royal Free Hospital campus, University College London Medical School, University College London (UCL).
06/2009 – 10/2009	Ιατρός στο ιδιωτικό ιατρικό κέντρο «Ιατρική Φροντίδα Αμμουδάρας», Αμμουδάρα, Ηράκλειο.
10/2008 – 05/2009	Επιστημονικός και Κλινικός συνεργάτης στο Αθηρωματικό, Μεταβολικό και ιατρείο Παχυσαρκίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου.
10/2008 – 02/2009	Εκπαιδεύτρια στο τμήμα «Νοσηλευτική Μ.Ε.Θ.» και «Ειδικός Κινησιοθεραπείας», 1^{ο} και 2^{ο} ΙΕΚ Ηρακλείου

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ – ΒΡΑΒΕΙΑ

09/2011 Υποτροφία από το Διαγνωστικό και Θεραπευτικό Κέντρο «Υγεία» στα πλαίσια μετεκπαιδευτικού προγράμματος ιατρών

08/2010 Υποτροφία από τη Ελληνική Εταιρία Αθηροσκλήρωσης για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής

07/2008 Υποτροφία για μεταπτυχιακές σπουδές για τον πρώτο σε κατάταξη στη σειρά αποφοίτησης φοιτητή από τη GlaxoSmithKline

05/2008 Βραβείο Διονυσίου Ίκκου για την ελεύθερη ανακοίνωση με τίτλο «Επιδημιολογική μελέτη και σύγκριση του φαινομένου της ενδο-οικογενειακής βίας μεταξύ μιας αγροτικής και μιας ημι-αστικής περιοχής του νομού Ηρακλείου Κρήτης», 20ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής.

2007-2008 Υποτροφία αριστείας από το Μελισσίδειο Ίδρυμα
Υποτροφία επίδοσης από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)
Βραβείο «Αίεν Αριστεύειν» από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)

2006-2007 Υποτροφία επίδοσης από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)
Βραβείο «Αίεν Αριστεύειν» από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)

2005-2006 Υποτροφία επίδοσης από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)
Βραβείο «Αίεν Αριστεύειν» από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)
Βραβείο «Μ. Παρισιάνου»από τον εκδοτικό οίκο Παρισιάνος Α.Ε.

2004-2005 Υποτροφία επίδοσης από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)
Βραβείο «Αίεν Αριστεύειν» από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)

2003-2004 Υποτροφία επίδοσης από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)
Βραβείο «Αίεν Αριστεύειν» από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)

2002-2003 Υποτροφία επίδοσης από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Ε. Λιουδάκη**, Ε. Γανωτάκης. HDL-χοληστερόλη: ένας νέος θεραπευτικός στόχος. *Αθηροσκλήρωση 2008*, 23:17-26.
2. **E. Lioudaki**, E. Ganotakis. Associations of thrombotic-hemostatic factors with cardiovascular disease. *Open Clinical Chemistry Journal 2010*, 3:25-37.
3. **E. Lioudaki**, E. Ganotakis, D. Mikhailidis. Ezetimibe; more than a low density lipoprotein cholesterol lowering drug? An update after 4 years. *Current Vascular Pharmacology 2010*, 9:62-86.
4. **E. Lioudaki**, E. Ganotakis, D. Mikhailidis, Nair DR. The Estrogenic Burden on Vascular Risk in Male-to-Female Transsexuals. *Current Pharmaceutical Design 2010*, 16:3815-22.
5. **Ε. Λιουδάκη**, Ε. Γανωτάκης, Ε. Δαφνής. Η ποδοκυττουρία ως πρώιμος δείκτης της διαβητικής νεφροπάθειας. *Ελληνική Επιθεώρηση Αθηροσκλήρωσης* 2011, 2: 47-51.
6. K. Stylianou, **E. Lioudaki**, E. Papadimitraki, C. Liotsi, G. Kokologiannakis, K. Giannakakis, V. Georgoulias, E. Daphnis. Crescentic glomerulonephritis associated with vascular endothelial growth factor inhibitor and bisphosphonate administration. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2011, 26: 1742-5
7. **E. Lioudaki**, G. Vrentzos, H. Mavrogeni, M.H. Zeniodi, E. Ganotakis , D. Mikhailidis, J. Papadakis. Prevalence of metabolic syndrome according to different definitions in a hypertensive population. *Angiology* 2012, 63: 39-47.
8. **E. Lioudaki**, E. Ganotakis, D. Mikhailidis. Lipid lowering drugs and gallstones; a therapeutic option? *Current Pharmaceutical Design* 2011, 17: 3622-31.
9. D. Mikhailidis, **E. Lioudaki**, E. Ganotakis. Liver enzymes; their role as potential cardiovascular risk markers. *Current Pharmaceutical Design* 2011, 17: 3632-43.
10. E. Mazokopakis, S. Karefilaki, P. Syros, **E. Lioudaki**, E. S. Ganotakis. Hepatosteatosis may reveal heterozygous familial hypobetalipoproteinemia. A case report. *Ελληνική Επιθεώρηση Αθηροσκληρωσης* 2011. In press.
11. N. Katsiki, **E. Lioudaki**, E. Ganotakis, D. Mikhailidis. Letter to the Editor, "Impact of Ezetimibe Coadministered With Statins on Cardiovascular Events

Following Acute Coronary Syndrome: A 3-Year Population-Based Retrospective Cohort Study in Taiwan". *Clinical Therapeutics* 2011, 33: 2091.

12. Stylianou K, Petrakis I, Mavroeidi V, Stratakis S, Kokologiannakis G, **Lioudaki** E, Liotsi C, Kroustalakis N, Vardaki E, Stratigis S, Perakis K, Kyriazis J, Nakopoulou L, Daphnis E. Rapamycin induced ultrastructural and molecular alterations in glomerular podocytes in healthy mice. Nephrol Dial Transplant. 2012 Jan 30.

13. Athyros VG, Karagiannis A, Ganotakis ES, Paletas K, Nicolaou V, Bacharoudis G, Tziomalos K, Alexandrides T, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP; Assessing The Treatment Effect in Metabolic syndrome without Perceptible diabeTes (ATTEMPT) Collaborative Group. Association between the changes in renal function and serum uric acid levels during multifactorial intervention and clinical outcome in patients with metabolic syndrome. A post hoc analysis of the ATTEMPT study. Curr Med Res Opin 2011,27: 1659-68.

14. Athyros VG, Elisaf MS, Alexandrides T, Achimastos A, Ganotakis E, Bilianou E, Karagiannis A, Liberopoulos EN, Tziomalos K, Mikhailidis DP; Assessing the Treatment Effect in Metabolic Syndrome Without Perceptible Diabetes (ATTEMPT) Collaborative Group.Long-term impact of multifactorial treatment on new-onset diabetes and related cardiovascular events in metabolic syndrome: a post hoc ATTEMPT analysis. *Angiology* 2012, 63: 358-66.

15. **E. Lioudaki**, M. Florentin, E. Ganotakis, D. Mikhailidis. Microalbuminuria: a neglected cardiovascular risk factor in non-diabetic individuals? *Current Pharmaceutical Design.* In press.

16. Petrakis I, Mavroeidi V, Stylianou K, Andronikidi E, **Lioudaki E**, Perakis K, Stratigis S, Vardaki E, Zafeiri M, Giannakakis K, Plaitakis A, Amoiridis G, Saraiva MJ, Daphnis E. Hsf-1 affects podocyte markers NPHS1, NPHS2 and WT1 in a transgenic mouse model of TTRVal30Met-related amyloidosis. *Amyloid* 2013, 20: 164-72.

17. **Lioudaki E**, Mavroeidi NG, Mikhailidis DP, Ganotakis ES. Subclinical hypothyroidism and vascular risk: an update. *Hormones (Athens)* 2013, 12: 495-506.

18. Mazokopakis EE, **Lioudaki E**, Ganotakis ES. Letter to the editor. *Angiology* 2014, 65: 323-4.

19. Androulakis E, **Lioudaki E**, Christophides T, Ahmad M, Fayed H, Laskar N, Schreiber B. Chronic thromboembolic pulmonary arterial hypertension: a review of the literature and novel therapeutic approaches. *Expert Rev Respir Med*. 2015 ;9(3):351-9

20. **Lioudaki E,** Stylianou KG, Petrakis I, Kokologiannakis G, Passam A, Mikhailidis DP, Daphnis EK, Ganotakis ES. Increased Urinary Excretion of Podocyte Markers in Normoalbuminuric Patients with Diabetes. *Nephron*. 2015;131(1):34-42. doi: 10.1159/000438493. Epub 2015 Sep 5.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. **E. Lioudaki**, K. Stylianou, M. Panteri, C. Choulaki, E. Ganotakis, E. Daphnis. Podocyturia as an early marker of diabetivc nephropathy. 49th ERA-EDTA Congress, 24-28 May 2012, Paris.

2. J. A. Papadakis, **E. Lioudaki**, G. Vrentzos, H. Mavrogeni, M.H. Zeniodi, E. Ganotakis , D. Mikhailidis. Prevalence of metabolic syndrome according to different definitions in a Mediterranean cohort of hypertensives. 26th Annual Scientific Meeting and Exposition of the American Society of Hypertension, Inc. 21-25 May 2011, New York, NY.

3. K Stylianou, **E. Lioudaki**, K Perakis, N Tzenakis, E Vardaki, S Stratigis, AG Holleboom, AW Schimmel, E Morava, J Kyriazis, A Evangeliou, E Ganotakis, E Daphnis, JA Kuivenhoven and RA Wevers. Clinical and biochemical characteristics of a large family with familial LCAT deficiency (FLD) due to a new mutation. World Congress of Nephrology, 8-12 April 2011, Vancouver, Canada.

4. Μ.Ε. Ζενιώδη, Ε. Σαλούστρος, Κ. Κουτσουδάκη, Μ. Νικολουδάκη, Α. Μαργιωλάκη, **Ε. Λιουδάκη**, Β. Γεωργούλιας, Δ. Μαυρουδής, Ε. Γανωτάκης. Κοιλακή παχυσαρκία και αύξηση σωματικού βάρους μετά από επικουρική χημειοθεραπεία με ταξάνες για πρώιμο καρκίνο μαστού. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης. 13-16 Οκτωβρίου 2010, Ιωάννινα.

5. Γ. Φάντη, Ι.Α. Παπαδάκης, Ε. Χουρδάκη, Γ.Κ. Παπάζογλου, Γ.Κλημαθιανάκης, **Ε. Λιουδάκη**, Ε. Γανωτάκης. Επίπτωση των κλασσικών παραγόντων κινδύνου

για καρδιαγγειακά νοσήματα σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς. 8ο Διεθνές Συνέδριο Παχυσαρκίας. 24-25 Οκτωβρίου 2008, Πάτρα

6. Γ. Μάραντος, Γ. Μελισσάς, Μ. Δασκαλάκης, **Ε. Λιουδάκη**, Α. Πεπέ, Α. Μαργιωρής, Ι. Παπαδάκης, Ι. Ματαλλιωτάκης. Μεταβολές του TNF-a σε νοσογόνα παχύσαρκες γυναίκες πριν και μετά την απώλεια βάρους με χειρουργικές μεθόδους. 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδομητρίωσης. 17-19 Οκτωβρίου 2008, Ηράκλειο
7. Θ. Βασιλόπουλος, Ι. Τσιλιγιάννη, Ν. Τσακουντάκης, Γ. Αρσένη, **Ε. Λιουδάκη**, Κ. Παυλάκη, Ε. Τραχανατζή. Επιδημιολογική μελέτη και σύγκριση του φαινομένου της ενδο-οικογενειακής βίας μεταξύ μιας αγροτικής και μιας ημι-αστικής περιοχής του νομού Ηρακλείου Κρήτης. 20ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής. Κυλλήνη, 30 Απριλίου – 4 Μαΐου 2008.
8. Π. Γκόγκολου, **Ε. Λιουδάκη**, Μ. Παπαδογιαννάκη, Κ. Παυλάκη, Χ. Σαϊτάκη, Μ. Τσιριγωτάκη, Μ. Χρυσουλάκη. Μελέτη εφαρμογής του προγνωστικού σκορ κατά Kohne στην έκβαση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου οι οποίοι λαμβάνουν πολυχημειοθεραπεία και μονοκλωνικά αντισώματα 2η Πανελλήνια Φοιτητική Συνάντηση: Σύγχρονες εξελίξεις στην Κλινική Ογκολογία – 15ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 8-10 Νοεμβρίου 2007, Ηράκλειο

ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ

1. Κλινικό φροντιστήριο: «Θεραπευτικές παρεμβάσεις (how to treat)», 17ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο Αθηροσκλήρωσης «Πρόληψη και Αντιμετώπιση του Καρδιαγγειακού Κινδύνου», 23-25 Σεπτεμβρίου 2011, Θεσσαλονίκη
2. Παρουσίαση περιστατικού, 31ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο «Λιπίδια στην Κλινική Πράξη», 12 Ιουνίου 2010, Αθήνα
3. Παρουσίαση περιστατικού, 30ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο «Λιπίδια στην Κλινική Πράξη», 10 Οκτωβρίου 2009, Αθήνα
4. Παρουσίαση περιστατικού, 29ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο «Λιπίδια στην Κλινική Πράξη», 7 Φεβρουαρίου 2009, Αθήνα

5. Παρουσίαση περιστατικού, 28ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο «Λιπίδια στην Κλινική Πράξη», 4 Οκτωβρίου 2008, Αθήνα
6. Στρογγυλό Τραπέζι: «Συμπληρωματική χημειοθεραπεία στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα», 2η Πανελλήνια Φοιτητική Συνάντηση: Σύγχρονες εξελίξεις στην Κλινική Ογκολογία – 15ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 8-10 Νοεμβρίου 2007
7. Παρουσίαση περιστατικού στα πλαίσια ομιλίας με θέμα «Εγκυμοσύνη και καρκίνος», 1η Πανελλήνια Φοιτητική Συνάντηση: Σύγχρονες εξελίξεις στην Κλινική Ογκολογία – 14ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 27-28 Οκτωβρίου 2006

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- 30α Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα στο Σακχαρώδη Διαβήτη, Β' Παθολογική Κλινική, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο, Ιατρική σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοέμβριος 2008.
- Immediate Life Support Provider από το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Αναζωογόνησης, Οκτώβριος 2008.
- Basic Life Support Provider από το Ευρωπαικό Συμβούλιο Αναζωογόνησης, Νοέμβριος 2005.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλική γλώσσα:	Certificate of Proficiency in English, University of Cambridge Certificate of Proficiency in English, University of Michigan Πιστοποίηση παρακολούθησης του σεμιναρίου «Προχωρημένα Ιατρικά Αγγλικά» από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης
Γερμανική γλώσσα:	Zertifikat, Goethe Institut.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί μια μάστιγα της σημερινής εποχής με συχνότητα που βαίνει συνεχώς αυξανόμενη. Με την πάροδο του χρόνου φαίνεται να αφορά όλο και μεγαλύτερο τμήμα του γενικού πληθυσμού και ευρύτερες ηλικιακές και φυλετικές ομάδες. Ωστόσο, και αν και είναι ευρέως γνωστό ότι πρόκειται για μία νόσο με σημαντικότατη νοσηρότητα και θνητότητα, αφενός πιθανά η συχνότητα με την όποια συναντάται στην κλινική πράξη, αφετέρου το γεγονός ότι για άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα ακολουθεί μπορεί να ακολουθεί υποκλινική πορεία, η βαρύτητα της νόσου τείνει να υποεκτιμάται.

Όπως γνωρίζουμε, ο ΣΔ σχετίζεται με μία σειρά επιπλοκών που βάλλουν σημαντικά την ποιότητα ζωής των ατόμων, ενώ σχετίζεται με υψηλή θνητότητα. Η διαβητική νεφρική νόσος (ΔΝΝ) αποτελεί τη συχνότερη αιτία νεφρικής νόσου τελικού σταδίου. Είναι γνωστό ότι οι ασθενείς με τελικού σταδίου νεφρική νόσο, ανεξάρτητα από την αιτιολογία αυτής ή της μεθόδου υποκατάστασης νεφρικής λειτουργίας (αιμοκάθαρση, περιτοναϊκή κάθαρση, μεταμόσχευση) έχουν μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης και χαμηλότερο επίπεδο ποιότητας ζωής. Κατά τη διάγνωση της ΔΝΝ υπάρχει ήδη εγκατεστημένη βλάβη και παρά τη φαρμακευτική αγωγή που αποσκοπεί στην επιβράδυνση της εξέλιξης της νεφρικής προσβολής, σημαντικό ποσοστό των ασθενών έχει προοδευτικά μειούμενη νεφρική λειτουργία με τις γνωστές συνέπειες.

Όπως και σε κάθε νόσο, η διάγνωση σε πρωιμότερα στάδια αποτελεί το ζητούμενο και αντικείμενο μελέτης με στόχο την αναχαίτιση της πορείας της νόσου. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού είναι σημαντικό να εστιάσουμε στα πρώιμα στάδια της παθοφυσιολογίας της ΔΝΝ και στην αναγνώριση μορίων-στόχων των οποίων η

προσβολή να είναι ανιχνεύσιμη με κατά το δυνατό απλούστερες μεθόδους εφαρμόσιμες στην κλινική πράξη. Κάτι τέτοιο θα επέτρεπε την έναρξη φαρμακευτικής αγωγής σε πρωιμότερο στάδιο με σκοπό την αποφυγή εγκατάστασης μόνιμης βλάβης.

Abstract

Background: Diabetes mellitus (DM) is a chronic illness characterized by impaired metabolism of carbohydrates, fat and protein secondary to a deficiency in secretion and/or action of insulin. Diabetic kidney disease is a major complication of DM with significant associated morbidity and mortality. A significant proportion of these patients are going to develop end-stage renal disease. Albuminuria has traditionally been used for the diagnosis and classification of diabetic kidney disease. At the same time, it is well-known that podocyte injury plays a crucial role in the pathogenesis and progression of diabetic kidney disease. We aimed to examine whether there is evidence suggestive of glomerular damage in patients with DM prior to the detection of albuminuria. Therefore, we investigated whether patients with DM and normoalbuminuria present podocyte markers in urine suggestive of early podocyte injury.

Methods:We studied 80 patients with type 2 DM who were examined at the Diabetes Clinic of the University Hospital of Heraklion, Crete, from January to June 2011. Exclusion criteria were (1) history of renal disease, (2) history of micro or macroalbuminuria, (3) presence of urinary infection, (4) known duration of DM <1 year and (5) use of nephrotoxic medication. We also studied 50 non-diabetic controls, some of whom were followed up in the metabolic clinic for hypertension (HTN) and/or hyperlipidemia without known renal disease. Exclusion criteria for control subjects were (1) history of DM, impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose, (2) history of renal disease, (3) history of micro/macroalbuminuria, (4) presence of urinary infection and (5) use of nephrotoxic medication. All the subjects were categorized according to their urinary podocyte marker profile into 2 groups, those with only synaptopodin mRNA presence (synaptopodin only group)

and those with nephrin and/or podocin mRNA presence in addition to synaptopodin in their urine (nephrin and/or podocin group).

Results: Nine diabetic patients and 11 controls were found to have an increased UAE (urine albumin to creatine ratio (ACR) >20 mg/g measured on enrollment) and, therefore, were not included in analysis. Among 71 patients with type 2 DM and 39 non-diabetic controls, all with normal UAE, synaptopodin mRNA was detected in the urine of all the diabetics and controls. The presence of nephrin and/or podocin mRNA in urine was more frequent among DM patients compared to controls (53.5 vs. 30.8%, respectively; $p = 0.022$). Binary logistic regression analysis revealed that the only significant predictor of the presence of nephrin and/or podocin mRNA in urine was the presence of DM (OR 2.59, 95% CI 1.14–5.91, $p = 0.024$, adjusted for all risk factors). A strong correlation between nephrin and podocin urinary mRNA levels was noted ($r = +0.796$, $p < 0.001$).

Conclusion: Overall, this study, including the largest population studied so far, demonstrated the presence of podocyte markers in the urine of normoalbuminuric diabetic patients. Nephrin and podocin mRNA is more prevalent in diabetic patients with normal UAE compared to controls, and this may reflect early podocyte injury. DM was the only significant determinant of their presence in urine of this population. Synaptopodin mRNA was uniformly detected in all the subjects independent of their DM status and, thus, synaptopodin is unsuitable for the diagnosis of podocyte injury. Therefore, it appears of particular importance to prospectively evaluate diabetic patients with urinary nephrin and/or podocin mRNA and normal UAE to clarify whether they are at increased risk of developing diabetic nephropathy, the relation to prognosis and if early treatment, for example, with angiotensin-converting enzyme inhibitors may retard the development of renal injury.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

1.1 Εισαγωγή

1.2 Ταξινόμηση

1.3 Διάγνωση

1.4 Επιδημιολογία

1.5 Επιπλοκές

2. ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

2.1 Εισαγωγή - Επιδημιολογία

2.2 Λευκωματινουρία

2.3 Παρεμβάσεις

3. ΤΟ ΣΠΕΙΡΑΜΑ

3.1 Ανατομία του σπειράματος

3.2 Σπειραματική Βασική Μεμβράνη (ΣΒΜ)

3.3 Ενδοθηλιακά κύτταρα

3.4 Μεσάγγειο

3.5 Ποδοκύτταρα

3.6 Οι πρωτεΐνες του λεπτού διαφράγματος

3.6.1 Νεφρίνη

3.6.2 Ποδοσίνη

3.6.3 CD2AP (CD2-associated protein)

3.6.4 ZO-1

3.6.5 FAT

3.6.6 P-καντερίνη

3.6.7 NEPH1

3.6.8 TRPC6 (Transient receptor potential cation channel C6)

3.7. Πρωτεΐνες της βασικής επιφάνειας - μόρια πρόσφυσης

3.7.1 Ιντεγκρίνες

3.7.2 Δυστρογλυκάνη

3.7.3 Κινάση συνδεόμενη με ιντεγκρίνη (ILK)

3.8 Ο κυτταροσκελετός

3.8.1 Συναπτοποδίνη

3.8.2 F-ακτίνη (πολυμερής ακτίνη)

3.8.3 α-ακτινίνη-4

3. 9 Άλλα ποδοκυτταρικά μόρια

3.9.1 Ποδοκαλυξίνη

3.9.2 WT1

4. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

4.1 Σπειραματική βλάβη

4.2 Σωληναριακή βλάβη

4.3 Αγγειακή βλάβη

5. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

5.1 Αιμοδυναμικοί παράγοντες

5.2 Μεταβολικοί παράγοντες

5.2.1 Τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης

5.2.2 Αυξητικοί παράγοντες

5.3 Φλεγμονή - κυττοκίνες

5.4 Σύστημα ρενίνης - αγγειοτενσίνης - αλδοστερόνης

5.5 Ενεργές ρίζες οξυγόνου

5.6 Κυκλοοξυγενάση και προστανοειδή

5.7 Άλλοι παράγοντες

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ο ρόλος της λευκωματινουρίας και η ανάγκη για πρωιμότερους δείκτες διάγνωσης

2. Ποδοκυτταρική βλάβη στις σπειραματοπάθειες

3. Το ποδοκύτταρο στη διαβητική νεφρική νόσο

4. Δείκτες ποδοκυτταρικής βλάβης στα ούρα

5. Σκοπός

6. Πληθυσμός και Μέθοδοι

6.1 Πληθυσμός της μελέτης

6.2 Εργαστηριακές μετρήσεις

6.3 Συλλογή δειγμάτων ούρων, προετοιμασία και εξαγωγή ολικού RNA

6.4 Αντίστροφη μεταγραφή

6.5 Ποσοτική, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Quantitative -PCR)

6.6 Στατιστική ανάλυση

7. Αποτελέσματα

7.1 Πληθυσμός και χαρακτηριστικά

7.2 Μετρήσεις στα ούρα

7.3 Σύγκριση ομάδων ανάλογα με το προφίλ έκφρασης ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα

7.4 Ανάλυση συσχέτισης

7.5 Δυαδική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης

8. Συζήτηση

8.1 Η παρουσία mRNA συναπτοποδίνης

8.2 Η ανίχνευση mRNA νεφρίνης και ποδοσίνης και η σχέση με την παρουσία ΣΔ

8.3 Απουσία ποδοκυτταρικών δεικτών σε νέα και υγιή άτομα

8.4 Η σημασία των ευρημάτων

8.5 Προηγούμενες μελέτες

8.6 Η ποδοκυττουρία και η επίδραση φαρμακευτικών ή άλλων παρεμβάσεων

8.7 Η σημασία της παρούσας μελέτης

8.8 Περιορισμοί της μελέτης

8.9 Το μέλλον

9. Βιβλιογραφία

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

1.1 Εισαγωγή

Ο ΣΔ είναι μια μεταβολική νόσος που χαρακτηρίζεται από διαταραχή του μεταβολισμού υδατανθράκων, λίπους και πρωτεΐνης και, ως εκ τούτου, χρόνια υπεργλυκαιμία ως αποτέλεσμα ανεπαρκούς έκκρισης ή/και δράσης ινσουλίνης [1]. Αποτελεί ουσιαστικά μία σύνθετη, χρόνια νόσο που απαιτεί συνεχή ιατρική φροντίδα με σκοπό το σωστό γλυκαιμικό έλεγχο αλλά και πολυπαραγοντική αντιμετώπιση όσον αφορά τη μείωση του κινδύνου. Η συνεχής εκπαίδευση των ασθενών και η υποστήριξη τους είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη των οξειών επιπλοκών και τη μείωση του τον κινδύνου των μακροπρόθεσμων επιπλοκών .

1.2 Ταξινόμηση

Ο ΣΔ μπορεί αδρά να ταξινομηθεί στις εξής κατηγορίες:

1. ΣΔ τύπου 1: οφείλεται σε καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος που συνήθως οδηγεί σε πλήρη ανεπάρκεια ινσουλίνης.
2. ΣΔ τύπου 2: αφορά την πλειοψηφία των περιπτώσεων (90%) και οφείλεται σε προοδευτική ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης επί παρουσίας αντίστασης στη δράση αυτής [1, 2].

3. ΣΔ κύησης: διαγιγνώσκεται κατά το δεύτερο ή τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης και δεν αφορά σαφώς έκδηλο ΣΔ).

4. Άλλοι τύποι ΣΔ: μονογονιδιακά σύνδρομα διαβήτη (όπως ο νεογνικός ΣΔ και ο ΣΔ τύπου MODY - maturity-onset diabetes of the young), ΣΔ που οφείλεται σε νόσους της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος (πχ. κυστική ίνωση) και ΣΔ που σχετίζεται με φάρμακα (πχ. αντιρετροϊκά ή ανοσοκατασταλτικά).

Σε κάποιες περιπτώσεις ασθενών είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια κατά πόσον πάσχουν από τύπου 1 ή 2 ΣΔ. Η κλινική εμφάνιση και η εξέλιξη της νόσου μπορεί να ποικίλουν σημαντικά και στις 2 μορφές ΣΔ. Συνήθως παιδιά με τύπου 1 εμφανίζοντια με διαβητική κετοξέωση. Ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις παιδιών, εφήβων και ενηλίκων υπάρχουν δυσκολίες στην εμφάνιση με την πραγματική διάγνωση να γίνεται προφανέστερη με την πάροδο των χρόνων.

1.3 Διάγνωση

Ο ΣΔ διαγιγνώσκεται με βάσει τα επίπεδα γλυκόζης πλάσματος, είτε τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας (fasting plasma glucose: FPG) είτε με τα επίπεδα γλυκόζης 2 ώρες μετά από τη λήψη 75 g γλυκόζης κατά τη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (Πίνακας 1). Πρόσφατα, τα επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης προστέθηκαν στα διαγνωστικά κριτήρια [3].

1.4 Επιδημιολογία

Η συχνότητα του ΣΔ είναι μεγαλύτερη στις ανεπτυγμένες χώρες σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες, με τον επιπολασμό του ΣΔ να βαίνει διαρκώς αυξανόμενος. Σύμφωνα με στοιχεία της Παγκόσμιας Ομοσπονδίας Διαβήτη (International Diabetes Federation: IDF), 415 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως πάσχουν από ΣΔ (90%

περιπτώσεων αφορούν ΣΔ τύπου 2), ενώ μέχρι το 2040, υπολογίζεται ότι 642 εκατομμύρια άτομα ή ένας στους δέκα, θα είναι διαβητικοί με τη μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται σε περιοχές όπως η Ασία και η Αφρική υπό την επιρροή της αστικοποίησης και της υιοθέτησης του δυτικού τρόπου ζωής [4].

1.5 Επιπλοκές

Η χρόνια υπεργλυκαιμία οδηγεί σε μια σειρά από μικροαγγειακές, μακροαγγειακές και νευροπαθητικές επιπλοκές. Όσον αφορά στις μικροαγγειακές επιπλοκές, οι κυριότερες είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η διαβητική νεφρική νόσος (ΔΝΝ). Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια σχετίζεται στενά με τη διάρκεια του ΣΔ. Η επίτευξη ευγλυκαιμίας έχει ως στόχο τη μείωση κυρίως των μικροαγγειακών επιπλοκών. Όπως έχουν δείξει αρκετές μελέτες, η βελτιστοποίηση του γλυκαιμικού ελέγχου σχετίζεται με χαμηλότερη συχνότητα μικροαγγειακών και νευροπαθητικών επιπλοκών καθώς και καθυστέρηση της εμφάνισης αυτών [5-8].

Η καρδιαγγειακή νόσος (ΚΑΝ) είναι η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας για τα άτομα με ΣΔ. Νόσοι που πολύ συχνά συνοδεύουν το ΣΔ όπως υπέρταση και δυσλιπιδαιμία αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου ΚΑΝ, ενώ και ο ίδιος ο ΣΔ συνεισφέρει επιπλέον και ανεξάρτητο κίνδυνο. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει τη σημασία της σωστής ρύθμισης των μεμονωμένων παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου για την πρόληψη ή την επιβράδυνση της ΚΑΝ σε άτομα με ΣΔ.

Όσον αφορά τις νευροπαθητικές επιπλοκές μπορεί να ποικίλουν ως προς τη φύση τους και την κλινική εμφάνιση. Η νευροπάθεια μπορεί να είναι εστιακή ή γενικευμένη. Οι συχνότερες μορφές νευροπαθειών στο ΣΔ είναι η χρόνια αισθητικοκινητική διαβητική πολυνευροπάθεια και η αυτόνομη νευροπάθεια. Σε

όλες τις παραπάνω περιπτώσεις ο στενός γλυκαιμικός έλεγχος με στόχο την επίτευξη ευγλυκαιμίας αποτελούν τη βασική αρχή πρόληψης και αντιμετώπισης.

Στη νεφροπάθεια σχετιζόμενη με το ΣΔ θα αναφερθούμε εκτενώς παρακάτω.

Διαγνωστικά κριτήρια ΣΔ
Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη ≥ 6.5**% ή**
Γλυκόζη νηστείας πλάσματος ≥ 126 mg/dl (Νηστεία ορίζεται ως η μη πρόσληψη θερμίδων για 8 ώρες) **ή**
Γλυκόζη πλάσματος στις 2 ώρες μετά την πρόσληψη γλυκόζης (75 g) > 200 mg/dl στην καμπύλη ανοχής γλυκόζης **ή**
Σε ασθενή με κλασικά συμπτώματα υπεργλυκαιμίας ή υπεργλυκαιμικής κρίσης και τυχαία γλυκόζη νηστείας > 200 mg/dl

Πίνακας 1: Διαγνωστικά κριτήρια ΣΔ

2. ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

2.1 Εισαγωγή - Επιδημιολογία

Η ΔΝΝ είναι μια από τις σημαντικότερες επιπλοκές του ΣΔ συνοδευόμενη από σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα [2], ενώ αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου πρώιμου καρδιαγγειακού θανάτου.

Ο ΣΔ είναι η κύρια αιτία της χρόνιας νεφρικής νόσου (ΧΝΝ) παγκοσμίως με το φτάνοντας το 30-50% στους αιμοκαθαιρώμενους ασθενείς [9]. Ποσοστό που κυμαίνεται από 20 έως 40% των ασθενών με ΣΔ τύπου 1 ή 2 θα αναπτύξει ΔΝΝ

εντός 20-25 ετών από την έναρξη της νόσου [10]. Ο επιπολασμός της νόσου φαίνεται να αυξάνεται ραγδαία πια και στις λεγόμενες αναπτυσσόμενες χώρες. Στη σύγχρονη βιβλιογραφία, ο όρος ΔΝΝ έχει αντικαταστήσει τον όρο διαβητική νεφροπάθεια που χρησιμοποιούταν παλαιότερα (κατ' αναλογία με τον όρο ΧΝΝ), ενώ ο όρος διαβητική σπειραματοπάθεια χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ιστολογική διάσταση της νόσου.

Για την οριστική διάγνωση της νεφρικής βλάβης από το ΣΔ απαιτείται η βιοψία νεφρικού ιστού. Ωστόσο, μέσα από τον προσεκτικό, προληπτικό έλεγχο των διαβητικών ασθενών μπορούν να αναγνωριστούν εκείνοι με διαβητική σπειραματοπάθεια..

2.2 Λευκωματινουρία

Για αρκετά χρόνια, η αυξημένη απέκκριση πρωτεΐνης και συγκεκριμένα λευκωματίνης στα ούρα (λευκωματινουρία) αποτέλεσε τον ακρογωνιαίο λίθο στη διάγνωση και παρακολούθηση της ΔΝΝ. Καθώς παρατηρήθηκε ότι σε αρκετές περιπτώσεις η αυξημένη αυτή απέκκριση λευκωματίνης υποχωρούσε αυτόματα, πλέον για την περιγραφή της ΔΝΝ απαιτείται η παρουσία <u>επίμονα</u> αυξημένης απέκκρισης λευκωματίνης [2, 11]. Ως φυσιολογική ορίζεται η απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα που δε ξεπερνάει τα 30 mg ημερησίως. Η εκτίμηση της λευκωματινουρίας μπορεί να επιτευχθεί είτε με τη συλλογή ούρων 24ώρου ή με τον υπολογισμό της αναλογίας επιπέδων λευκωματίνης ούρων προς κρεατινίνη ούρων (albumin/creatinine ratio; ACR) σε τυχαίο δείγμα ούρων που αποτελεί έναν πιο εύχρηστο, ωστόσο αξιόπιστο τρόπο εκτίμησης της λευκωματινουρίας εμφανίζοντας στενή συσχέτιση με την 24ωρη απέκκριση λευκωματίνης [12]. Για τη διάγνωση της λευκωματινουρίας και δεδομένης της διακύμανσης στην απέκκριση της

λευκωματίνης στα ούρα, απαιτούνται τουλάχιστον δύο από τρία δείγματα θετικά εντός διαστήματος 3 έως 6 μηνών. Παράγοντες όπως η άσκηση εντός 24 ωρών, λοίμωξη, πυρετός, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, εκσεσημασμένη υπεργλυκαιμία και υπέρταση μπορεί να αυξήσουν παροδικά την απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα υψηλότερα από τα συνήθη για το άτομο επίπεδα.

Μέχρι πρότινος χρησιμοποιούταν ο όρος "μικρολευκωματινουρία" για να περιγράψει την απέκκριση λευκωματίνης σε επίπεδα 30 έως 299 mg ημερησίως και ο όρος "μακρολευκωματινουρία" ή "πρωτεϊνουρία" για υψηλότερα επίπεδα απέκκρισης λευκωματίνης στα ούρα (> 300 mg / 24ωρό). Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, η λευκωματινουρία αποτελεί ουσιαστικά μια συνεχή μεταβλητή [13] και ακόμα και τιμές λευκωματινουρίας στα ανώτερα από τα κλασικά θεωρούμενα ως φυσιολογικά επίπεδα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΧΝΝ αλλά και ΚΑΝ [14-16]. Θεωρείται μάλιστα ότι πρωτεϊνουρία δεν είναι απλά ένας δείκτης της σπειραματικής βλάβης, ούτε απλώς ένας προγνωστικός δείκτης της εξέλιξης της ΧΝΝ και ΚΑΝ, αλλά έχει αιτιολογικό ρόλο στην παθογένεια [17]. Τα υψηλά επίπεδα λευκωματίνης κατακλύζουν τη μεταβολική ικανότητα των νεφρικών σωληναρίων, επάγοντας έτσι την φλεγμονή και οδηγώντας σε σωληναροδιάμεση ίνωση και επακόλουθη μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (ΡΣΔ). Η δυνατότητα παρέμβασης πριν από τα γεγονότα αυτά είναι ζωτικής σημασίας, καθώς μετά την ουλοποίηση στο σωληναροδιάμεσο ιστό και σπείραμα η βλάβη είναι μη αναστρέψιμη. Η επακόλουθη ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης αγγειοτενσίνης αλδοστερόνης (ΣΡΑΑ) έχει γνωστές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα και ως εκ τούτου συμβάλλει στην αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου.

Στη πιο σύγχρονη βιβλιογραφία οι παραπάνω όροι "μικρολευκωματινουρία" και "μακρολευκωματινουρία" αντικαθίστανται από τον ενιαίο όρο λευκωματινουρία, με

σκοπό να τονισθεί ο διαρκής χαρακτήρας της αυξημένης απέκκρισης λευκωματίνης ούρων ως παράγοντα κινδύνου, ενώ χρησιμοποιείται και ο όρος επίμονη λευκωματινουρία. Ως λευκωματινουρία ορίζεται η παρουσία λευκωματίνη ούρων / κρεατινίνη ούρων > 30 mg / g.

Η επίμονη λευκωματουρία σε επίπεδα ACR 30 έως 299 mg / g αποτελεί ένα πρώιμο δείκτη ανάπτυξης ΔΝΝ σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 και 2, ενώ έχει αναδειχθεί η σημασία της ως δείκτη αυξημένου κινδύνου ΚΑΝ [18-20]. Αυτόματη υποστροφή της λευκωματινουρίας σε επίπεδα ACR 30-299 mg/g έχει παρατηρηθεί σε ποσοστό έως και 40 % των ασθενών με διαβήτη τύπου 2. Περίπου 30-40 % των ασθενών σε ACR των 30-299 mg/g δεν εμφανίζουν επιδείνωση της λευκωματινουρίας παραμένοντας σε σταθερά επίπεδα μετά από 5 έως 10 χρόνια [21-23]. Επίσης, συγκρίνοντας ασθενείς με ίσης διάρκειας ΣΔ, έχουν παρατηρηθεί παθολογικά ευρήματα σε επίπεδο σπειράματος που δε διαφέρουν μεταξύ εκείνων με φυσιολογική απέκκριση λευκωματίνης ούρων και λευκωματινουρία σε επίπεδα < 300 mg/g [24]. Τέλος, η ποσότητα της απεκκρινόμενης πρωτεΐνης στα ούρα σχετίζεται με την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και την πιθανότητα εξέλιξης της ΔΝΝ σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο [17, 25, 26].

2.3 Παρεμβάσεις

Όπως προαναφέρθηκε, η ΔΝΝ από σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα κυρίως σχετιζόμενη με ΚΑΝ [2]. Η μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ΔΝΝ καθώς και η επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου μπορούν να επιτευχθούν μέσα από μία σειρά παρεμβάσεων. Η εντατικοποίηση της αγωγής και η επίτευξη σχεδόν ευγλυκαιμίας μπορεί να καθυστερήσει την εμφάνιση και να επιβραδύνει την εξέλιξη της λευκωματινουρίας και της μείωσης του ΡΣΔ. Ζωτικής σημασίας είναι επίσης η

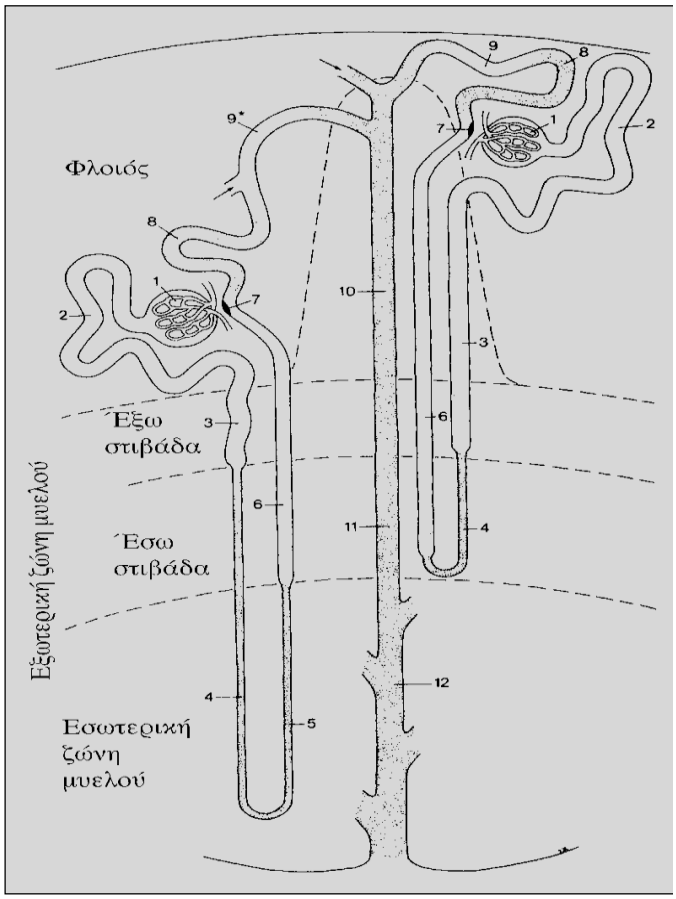
σωστή ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης (ΑΠ) όπως έχει δείξει η γνωστή μελέτη UKPDS - UK Prospective Diabetes Study. Επιπλέον, μεγάλες προοπτικές τυχαιοποιημένες μελέτες σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 έχουν δείξει ότι οι αΜΕΑ επιτυγχάνουν χαμηλότερα επίπεδα συστολικής ΑΠ (<140 mmHg) και έχουν ένα επιλεκτικό όφελος έναντι των άλλων κατηγοριών αντιυπερτασικών φαρμάκων επιβραδύνοντας την εξέλιξη της λευκωματινουρίας και την έκπτωση του ΡΣΔ στα άτομα με υψηλότερα επίπεδα λευκωματινουρίας [27, 28]. Επίσης σε άτομα με ΣΔ και υπέρταση αλλά φυσιολογική απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα φαίνεται ότι η αναστολή του ΣΡΑΑ καθυστερεί την εμφάνιση λευκωματινουρίας [29]. Οι αΜΕΑ φαίνεται επίσης ότι μειώνουν τα καρδιαγγειακά επεισόδια σε ασθενείς με ΣΔ [30] γεγονός που υποστηρίζει περαιτέρω τη χρήση αυτών σε ασθενείς με λευκωματουρία, που αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Οι αναστολείς των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης δεν έχουν εξίσου ευεργετικό αποτέλεσμα όσον αφορά στον καρδιαγγειακό κίνδυνο και την εμφάνιση της λευκωματινουρίας σε διαβητικούς ασθενείς με φυσιολογική ΑΠ [31]. Φαίνεται όμως ότι μπορούν να επιβραδύνουν την εξέλιξη της λευκωματινουρίας και της τελικού σταδίου νεφρικής νόσου σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 [32].

3. ΤΟ ΣΠΕΙΡΑΜΑ

3.1 Ανατομία του σπειράματος

Όπως προαναφέρθηκε, η ΔΝΝ αποτελεί μια σπειραματοπάθεια και για την ακρίβεια τη συχνότερη εκ των σπειραματοπαθειών.

Ο νεφρώνας είναι η ανατομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού είναι και αποτελείται από το αγγειώδες σπείραμα με την κάψα του Bowman που το περιβάλλει, το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, την αγκύλη του Henle, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο, την παρασπειραματική συσκευή και το αθροιστικό σωληνάριο (Εικόνα 1).



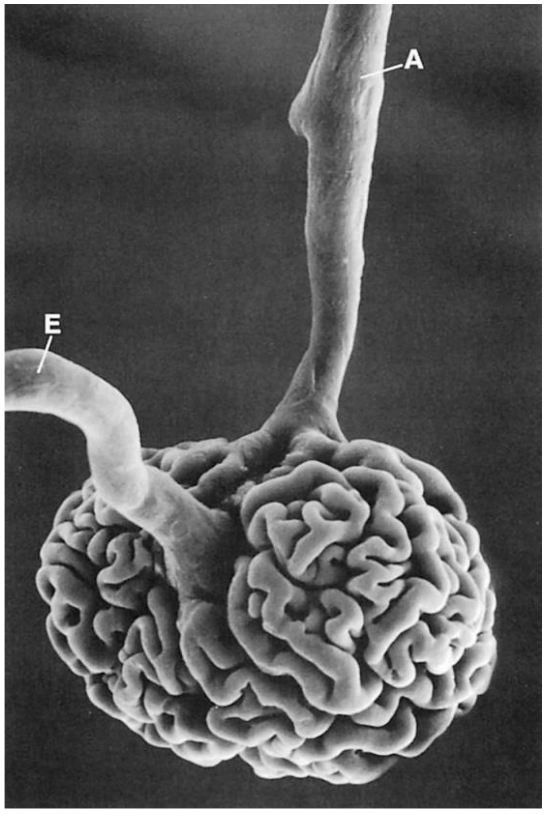
Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση του νεφρώνα: 1. Αγγειώδες σπείραμα, 2.Εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, 3. Εγγύς ευθύ σωληνάριο, 4. Λεπτό κατιόν σκέλος της αγκύλης του Henle, 5. Λεπτό ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle, 6. Άπω ευθύ σωληνάριο, 7.Παρασπειραματική συσκευή, 8. Άπω εσπειραμένο σωληνάριο, 9. Συνδετικό σωληνάριο, 10-12.Αθροιστικό σωληνάριο.
Από: Heptinstall's Pathology of the kidney, 6th edition

Το σπείραμα ή αλλιώς σπειραματικός ηθμός αποτελεί τη λειτουργική διηθητική μονάδα του νεφρού, επιτρέποντας τη διέλευση μεγάλων ποσοτήτων ελεύθερου ύδατος καθώς και ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους, διατηρώντας παράλληλα τη συντριπτική πλειοψηφία των πρωτεϊνών του πλάσματος μέσα στον ενδαγγειακό χώρο.

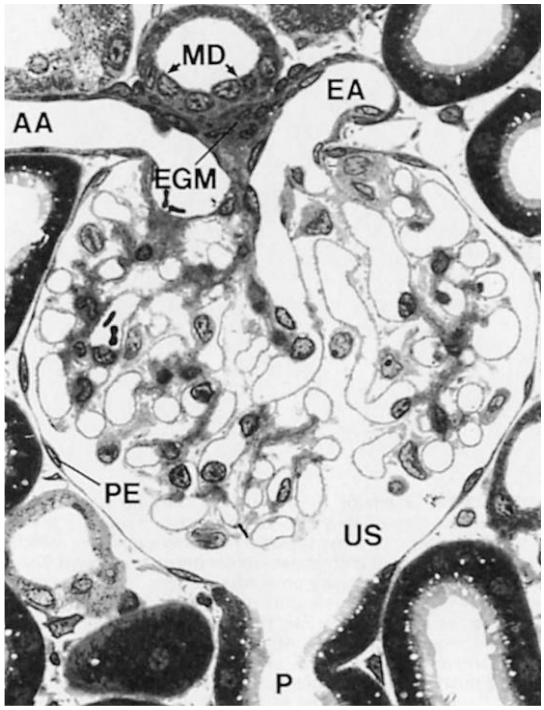
Ουσιαστικά, το σπείραμα αποτελείται από τριχοειδή αγγεία, που διαπλέκονται μεταξύ τους και υποστηρίζονται από τα μεσαγγειακά κύτταρα στο διάμεσο ιστό. Τα τριχοειδή του σπειράματος τροφοδοτούνται με αίμα από τα προσαγωγά αρτηρίδια. Κάθε προσαγωγό αρτηρίδιο διακλαδίζεται σε πολλές τριχοειδείς αγκύλες όπου γίνεται η υπερδιήθηση του αίματος. Οι τριχοειδείς αγκύλες συγκλίνουν στο απαγωγό αρτηρίδιο το οποίο εγκαταλείπει το σπείραμα για να σχηματίσει ένα δεύτερο τριχοειδικό δίκτυο που περιβάλλει τα νεφρικά σωληνάρια (Εικόνες 2 και 3). Τα τριχοειδή κάθε αγκύλης περιελίσσονται γύρω από μια κεντρική περιοχή, το μεσάγγειο έχοντας τη μια πλευρά ελεύθερη, όπου γίνεται η διήθηση και την απέναντι πλευρά συνεχόμενη με το μεσάγγειο (Εικόνα 4). Στην ελεύθερη πλευρά και από έξω προς τα μέσα διακρίνουμε τρεις στοιβάδες: τη στοιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων ή ποδοκυττάρων, τη σπειραματική βασική μεμβράνη (ΣΒΜ) και τη στοιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην μεσαγγειακή πλευρά των τριχοειδών το ενδοθήλιο βρίσκεται σε άμεση επαφή με το μεσάγγειο το οποίο αποτελείται από τα μεσαγγειακά κύτταρα και τη μεσάγγειο θεμέλια ουσία.

Το μοναδικό χαρακτηριστικό των τριχοειδών του σπειράματος είναι ότι επιτρέπουν τη διέλευση του νερού (υπερδιήθηση) στην ουροφόρο χώρο παραμένοντας αδιαπέραστα ταυτόχρονα προς τις πρωτεΐνες. Εξελικτικά, τα κύτταρα του νεφρώνα προέρχονται από το ενδιάμεσο μεσόδερμα και απαιτείται η επαγωγή του μεσεγχύματος σε επιθήλιο για το σχηματισμό του. Ο ηθμός είναι ελεύθερα

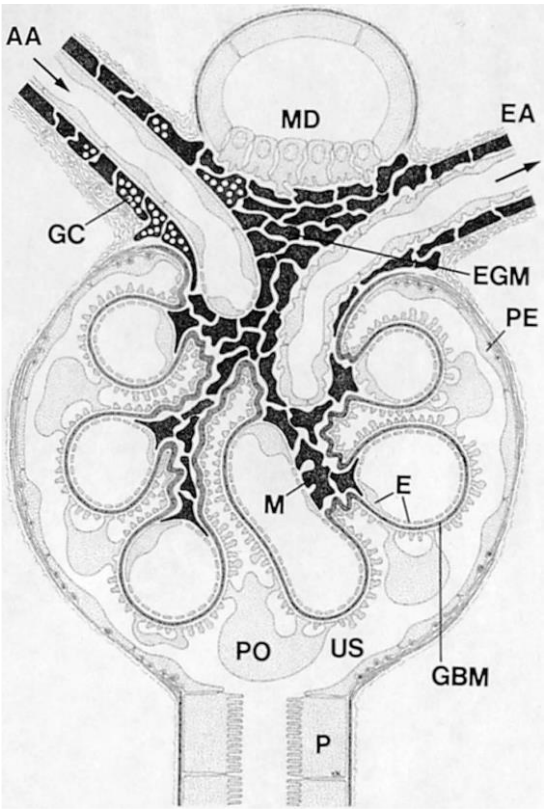
διαπερατός από το νερό και τους ηλεκτρολύτες, ενώ για μεγαλύτερες ουσίες όπως οι πρωτεΐνες η διαπερατότητα καθορίζεται από το μέγεθος και το ηλεκτρικό φορτίο.



Εικόνα 2: Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σπειραμάτος σκύλου με το προσαγωγό (A: Afferent arteriole AA) και το απαγωγό αρτηρίδιο (Efferent arteriole: EA). Είναι εμφανής η επιφανειακή διακλάδωση του προσαγωγού αρτηριδίου από όπου παροχετεύεται όλη η προσαγωγός αγγειακή μοίρα. Το προσαγωγό αρτρίδιο αναδύεται από το εσωτερικό του σπεράματος.
Από: Seldin and Giebisch's. The Kidney Physiology and Pathophysiology, 4th edition



Εικόνα 3: Επιμήκης τομή του σπειράματος. Διακρίνεται το προσαγωγό αρτηρίδιο (AA) στον αγγειακό πόλο διακλαδιζόμενο σε τριχοειδείς αγκύλες που συγκλίνουν στο απαγωγό (EA) το οποίο εγκαταλείπει το σπείραμα. Την κάψα του Bowman επενδύουν τοιχωματικά επιθηλιακά κύτταρα (PE). Επίσης διακρίνονται το εξωσπειραματικό μεσάγγειο (EGM:extraglomerular mesangium), η πυκνή κηλίδα (MD: macula densa) και το αρχικό τμήμα του εγγύς σωληναρίου (P) στον ουροφόρο πόλο. *Από: Seldin and Giebisch's. The Kidney Physiology and Pathophysiology, 4th edition*



Από: Seldin and Giebisch's. The Kidney Physiology and Pathophysiology, 4th edition

Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση επιμήκους τομής ενός νεφρώνα και της παρασπειραματικής συσκευής. Οι τριχοειδικές αγκύλες επενδύονται από θυριδωτό ενδοθήλιο. Διακρίνονται το προσαγωγό (AA) και απαγωγό (EA) αρτηρίδιο. Οι δομές περιβάλλονται από τη ΣΒΜ (GBM). Χαρακτηριστικά είναι τα ποδοκύτταρα (PO) που καλύπτουν τη ΣΒΜ με το διαπλεκόμενο μοτίβο των προεκβολών τους. Διακρίνονται το εξωσπειραματικό μεσάγγειο (EGM) και η πυκνή κηλίδα (MD) στον αγγειακό πόλο και το εγγύς σωληνάριο (P) στον ουροφόρο πόλο.

3.2 Σπειραματική Βασική Μεμβράνη (ΣΒΜ)

Η ΣΒΜ διακρίνεται σε ένα περιαγγειακό και ένα περιμεσαγγειακό τμήμα. και έχει πάχος 250-350 nm ανάλογα με την ηλικία. Αποτελείται από τρεις διαφορετικές στοιβάδες: μια παχιά κεντρική, το πυκνό πέταλο (Lamina Densa), το έσω πέταλο (Lamina Rara Interna) που έρχεται σε επαφή με το ενδοθήλιο και το έξω πέταλο (Lamina Rara Externa) που έρχεται σε επαφή με τα επιθηλιακά κύτταρα. Τα

συστατικά της ΣΒΜ συντίθενται κυρίως από τα ποδοκύτταρα αλλά μπορεί να συμμετέχουν και τα ενδοθηλιακά κα μεσαγγειακά κύτταρα σε κάποιο βαθμό. Τα κύρια συστατικά της είναι κολλαγόνο τύπου IV και V, λαμινίνη, πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες (εντακτίνη και ινωδοδεκτίνη). Η λαμινίνη σχηματίζει ένα δεύτερο δίκτυο που υπέρκειται εκείνου του κολλαγόνου. Με τη βοήθεια της εντακτίνης προσφύεται στο κολλαγονικό δίκτυο καθώς και σε υποδοχείς επιφανείας των ποδοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων (δυστρογλυκάνες και ιντεγκρίνες). Ο συνδυασμός αυτών των δύο δικτύων (λαμινίνης και κολλαγονικού) παρέχουν μηχανική υποστήριξη στη μεμβράνη και λειτουργούν ως σκελετός για τα συστατικά του στρώματος.

Οι πρωτεογλυκάνες αποτελούνται από βασικές πρωτεΐνες και ομοιοπολικά συνδεδεμένες γλυκοζαμινογλυκάνες συσσωρευμένες στο εξωτερικό και εσωτερικό πέταλο. Το ηλεκτροαρνητικό φορτίο της ΣΒΜ οφείλεται κυρίως στις πολυανιονικές πρωτεογλυκάνες.

3.3 Ενδοθηλιακά κύτταρα

Το τοίχωμα των τριχοειδών καλύπτεται από στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που προσκολλώνται στην εσωτερική επιφάνεια της ΣΒΜ μέσω λεπτών ινιδίων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι μεγάλα κύτταρα που αποτελούνται από ένα κυτταρικό σώμα και το περιφερικό θυριδωτό τους τμήμα. Το τελευταίο δίνει στο ενδοθήλιο το χαρακτηριστικό σχηματισμό με οπές διαμέτρου 50-100 nm (fenestrations), η πλειονότητα των οποίων φαίνεται να στερείται διαφράγματος με τις συνήθεις τεχνικές χρώσης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Εικόνα 4). Νεότερες τεχνικές αποκαλύπτουν την παρουσία διαφραγμάτων σε μεγάλο αριθμό θυρίδων. Τα

ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτονται από ένα λεπτό στρώμα γλυκοπρωτεΐνης πλούσιας σε σιαλικό οξύ, η οποία φορτίζει αρνητικά την επιφάνεια των κυττάρων.

3.4 Μεσάγγειο

Το μεσάγγειο αποτελεί εξειδικευμένο ιστό των νεφρώνων και συνίσταται από μεσαγγειακά κύτταρα και μεταξύ αυτών άμορφη ουσία, η οποία καλείται μεσαγγειακή θεμέλιος ουσία (matrix). Τα μεσαγγειακά κύτταρα διακρίνονται σε αυτόχθονα ή τύπου Ι, σε κύτταρα τύπου ΙΙ και κύτταρα τύπου ΙΙΙ. Τα τύπου Ι προέρχονται από τα λεία μυϊκά κύτταρα και εκκρίνουν κολλαγόνο IV και V, ινωδονεκτίνη και προσταγλανδίνες, ενώ άλλες ιδιοτήτες τους είναι η ενδοκύττωση και η φαγοκύττωση. Τα κύτταρα τύπου ΙΙ εμφανίζουν χαρακτήρες μονοκυττάρων και μακροφάγων, ενώ τα τύπου ΙΙΙ προέρχονται από κυκλοφορούντα μονοκύτταρα τα οποία παγιδεύονται στο μεσάγγειο του σπειράματος.

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, έτσι ώστε η διάμετρός τους να μεταβάλλεται ανάλογα με τη συσπαστική ή διασταλτική δράση του μεσαγγείου. Οι κυριότερες λειτουργίες του μεσαγγείου είναι: α) η συλλογή και απομάκρυνση μεγαλομοριακών ουσιών όπως ανόργανα σωματίδια, πολυσακχαρίτες και ανοσοσυμπλέγματα β) η ρύθμιση της κυκλοφορίας του σπειράματος γ) παραγωγή ορμονών και δομικών πρωτεογλυκανών και δ) η τοπική ανοσορρύθμιση-παραγωγή ελευθέρων ριζών.

3.5 Ποδοκύτταρα

Τα ποδοκύτταρα είναι επιθηλιακά κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης χωρίς ή με πολύ αργό ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τα οποία επενδύουν την εξωτερική επιφάνεια της ΣΒΜ [33]. Τα ώριμα ποδοκύτταρα εμφανίζουν μια σειρά από μοναδικά ανατομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, τα οποία σχετίζονται με εξειδικευμένο ρόλο τους.

Το κυτταρικό σώμα κείται στον ουροφόρο χώρο και χαρακτηρίζεται από μεγάλο πυρήνα και ογκώδες κυτταρόπλασμα με πολύ αναπτυγμένο σύστημα Golgi και ενδοπλασματικό δίκτυο, χαρακτηριστικά λυσοσωμάτια και πολλά μιτοχόνδρια. Η πυκνότητα των οργανιλίων του κυτταροπλάσματος υποδηλώνει την μεγάλη μεταβολική δραστηριότητα του κυττάρου. Τα ποδοκύτταρα συνθέτουν τα περισσότερα συστατικά της ΣΒΜ. Από το κυτταρικό σώμα εξορμώνται οι πρωτογενείς ποδοειδείς εκβλαστήσεις. Αυτές επεκτείνονται περαιτέρω για να σχηματίσουν τις λεπτότερες, δευτερογενείς ποδοειδείς εκβλαστήσεις που υποστηρίζονται από ινίδια μικροσωληνίσκων και από τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Ο κυτταροσκελετός των ποδοκυττάρων δομείται από ένα πολύπλοκο δίκτυο μικροΐνιδίων και μικροσωληνίσκων, αποτελούμενο κυρίως από ακτίνη, συναπτοποδίνη και άλλες πρωτεΐνες. Τα μόρια αυτά συνδέονται με τη ΣΒΜ κυρίως μέσω των συμπλεγμάτων των α3β1-ιντεγκρινών. Ο σκελετός αυτός, αντιδρώντας σε μεγάλη ποικιλία παραγόντων, επιτρέπει στα ποδοκύτταρα να διαδραματίζουν σοβαρό ρόλο στο σπειραματικό ηθμό.

Οι δευτερογενείς εκβλαστήσεις διαπλέκονται περαιτέρω και περιβάλλουν τα τριχοειδή από την εξωτερική τους πλευρά. Οι εκβλαστήσεις ενός ποδοκυττάρου διαπλέκονται με εκείνες των γειτονικών ποδοκυττάρων σχηματίζοντας τα λεπτά διαφράγματα (ΛΔ) που τις γεφυρώνουν και συνιστούν τον φραγμό μεγέθους. Το ΛΔ είναι ζωικής σημασίας για την ακεραιότητα του σπειραματικού ηθμού καθώς πέρα

από τη δομή, συμμετέχει στη διακυτταρική επικοινωνία. Για αυτό το λόγο, άλλωστε, αποτελεί βασικό "στόχο" στην παθολογία του σπειράματος. Ουσιαστικά, πρόκειται για μια κύτταρο-προς-κύτταρο σύνδεση που παρουσιάζει κανονικότητα ως προς την ανατομία της, σχηματίζοντας χάσματα που δεν ξεπερνούν τα 40 nm. Το ΛΔ διασταυρώνεται από εξωκυττάριες πρωτεΐνες, ανάμεσα στις οποίες το διαμεμβρανικό τμήμα της νεφρίνης αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό. Η δομή αυτή δημιουργεί το φραγμό μεγέθους στη διήθηση ουσιών, αποτρέποντας τη διέλευση πρωτεϊνών μεγαλύτερων από τη λευκωματίνη και συμβάλλει στην αύξηση της αντίστασης των σπειραματικών τριχοειδών στις δυνάμεις διάτασης που προέρχονται από την αυξημένη πίεση στο εσωτερικό τους. Το αρνητικό φορτίο της επιφάνειας του ποδοκυττάρου δημιουργείται από ένα στρώμα σιαλογλυκοπρωτεϊνών που καλύπτει τα ποδοκύτταρα και τις προεκβολές τους. Ωστόσο, στο φραγμό φορτίου συμμετέχουν και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και η ΣΒΜ.

Τα ώριμα ποδοκύτταρα εμφανίζουν τόσο επιθηλιακά όσο και μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά και έχουν κοινούς φαινοτυπικούς δείκτες τόσο με νευρώνες [34, 35] όσο και κύτταρα λείου μυός, ενώ παρουσιάζουν και λειτουργικές ομοιότητες με τα τριχοειδικά περικύτταρα [36, 37]. Έχουν αναγνωριστεί μία σειρά πρωτεϊνών με σημαντικό ρόλο τόσο για τη δομική ακεραιότητα του κυττάρου και του λεπτού διαφράγματος όσο και ως σηματοδοτικά μόρια (Εικόνα 5). Μερικές από τις πιο σημαντικές περιγράφονται παρακάτω.

3.6 Οι πρωτεΐνες του λεπτού διαφράγματος

3.6.1 Νεφρίνη

Η νεφρίνη είναι μία από τις πρωτεΐνες της πλαγίας επιφάνειας και αποτελεί κεντρικό δομικό και σηματοδοτικό μόριο στο ΛΔ. Η μετάλλαξη του γονιδίου προκαλεί τον

Φιλανδικό τύπο συγγενούς νεφρωσικού συνδρόμου (CNF) που κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και εμφανίζεται σε 1/10.000 γεννήσεις στη Φιλανδία [38]. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 50 μεταλλάξεις του γονιδίου που ως επί το πλείστον χαρακτηρίζονται από μαζική λευκωματινουρία ήδη κατά την ενδομήτρια ζωή. Η θεραπεία των ασθενών με CNF συνίσταται σε πρώιμη νεφρεκτομή και αιμοκάθαρση έως ότου η ηλικία του παιδιού να καθιστά δυνατή τη μεταμόσχευση. Η μεταμόσχευση εμφανίζει 20% ποσοστό υποτροπής του νεφρωσικού συνδρόμου εξαιτίας της δημιουργίας αντισωμάτων έναντι της νεφρίνης

Η νεφρίνη έχει σημαντικό ρόλο τόσο για την κυτταρική πρόσφυση όσο και για και την κυτταρική επικοινωνία. Αποτελείται από ένα μεγάλο εξωκυττάριο NH2-τελικό άκρο, το ενδοκυττάριο τμήμα της καθώς και ένα διαμεμβρανικό. Το NH2- άκρο της νεφρίνης με τις 8 ανοσοσφαιρινικές επαναλήψεις αλληλεπιδρά με το αντίστοιχο καθώς και το NEPH1 μόριο της απέναντι ποδικής εκβλάστησης [39]. Τα μόρια αυτά διατάσσονται αλληλοδιαδοχικά και σχηματίζουν μια δομή σαν φερμουάρ [40].

Αξίζει να σημειωθεί ότι από το σύνολο των μεταλλάξεων που έχουν περιγραφεί σε ανθρώπινα ποδοκύτταρα, οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο της νεφρίνης εμφανίζουν τις πρωιμότερες και σοβαρότερες κλινικές εκδηλώσεις, υποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο αυτής την πρωτεΐνης για την ακέραιη λειτουργία της διήθησης. Έχουν περιγραφεί αρκετές διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της νεφρίνης και σχετίζονται σχεδόν πάντοτε με σοβαρό κλινικό φαινότυπο με την έναρξη σοβαρής λευκωματινουρίας ήδη κατά την ενδομήτρια ζωή ή εντός των πρώτων 3 μηνών ζωής [41]. Αυτό δείχνει ότι η διαταραχή της λειτουργίας του σχεδόν οποιασδήποτε περιοχής της νεφρίνης έχει σοβαρές συνέπειες για την ακεραιότητα του ποδοκυττάρου και δεν μπορεί να αντισταθμιστεί εξελικτικά.

- **Η νεφρίνη στις σπειραματοπάθειες**

Σε διάφορους τύπους σπειραματοπαθειών στον άνθρωπο όπως και σε ζωικά μοντέλα, η έκφραση νεφρίνης φαίνεται να είναι σε αρνητική ρύθμιση. Το γεγονός ότι η έλλειψη της νεφρίνης προκαλεί πρωτεϊνουρία ώθησε την έρευνα στην αντίστροφη κατεύθυνση, δηλαδή τι συμβαίνει αναφορικά με τη νεφρίνη στις διάφορες σπειραματοπάθειες με πρωτεϊνουρία, πειραματικές και μη.

Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι σε περιπτώσεις νεφρωσικού συνδρόμου η νεφρίνη και η ποδοσίνη κατανέμονται μακριά από το ΛΔ, όπου εντοπίζονται φυσιολογικά [42, 43]. Επίσης υπάρχουν ιστολογικά δεδομένα από ανθρώπινες βιοψίες [44, 45] και ζωικά μοντέλα [46, 47] που δείχνουν ότι η κατανομή της νεφρίνης, ποδοσίνης και CD2AP μεταβάλλεται από γραμμική επί της τριχοειδικής αγκύλης σε κοκκιώδη κυτταροπλασματική [48].

Με τη χρήση real time-PCR σε απομονωμένα σπειράματα, βρέθηκε ότι το mRNA της νεφρίνης είναι ελαττωμένο σε ασθενείς με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων (ΝΕΑ) και μεμβρανώδη σπειραματοπάθεια. Σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι σε ασθενείς με ΝΕΑ, ΕΤΣΣ και μεμβρανώδη αλλά όχι σε IgA νεφροπάθεια υπάρχει μειωμένη έκφραση τόσο της πρωτεΐνης όσο και του mRNA της νεφρίνης καθώς και ανακατανομή της στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, που οδηγεί σε αποδιάταξη του συμπλέγματος που συνιστά το ΛΔ [49].

Όσον αφορά στη ΔΝΝ, σε ζωικά μοντέλα α) με νεφροπάθεια από στρεπτοζοτοκίνη και β) μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια, βρέθηκε σημαντική αύξηση του mRNA της νεφρίνης με ανακατανομή της πρωτεΐνης από την επιφάνεια προς το εσωτερικό του κυττάρου [50]. Επίσης στο πρώτο από τα παραπάνω μοντέλα, παρατηρήθηκε απώλεια πρωτεΐνης νεφρίνης στα ούρα.

Στη ΔΝΝ φαίνεται ότι η έκφραση νεφρίνης μειώνεται καθώς εξελίσσεται λευκωματουρία [42, 51, 52] και ότι αυτό συμβαίνει ανεξάρτητα από την έκφραση άλλων μορίων του ΛΔ, όπως η ποδοσίνη και η CD2AP, υποδεικνύοντας ότι η μειωμένη έκφραση νεφρίνης είναι κάτι παραπάνω από ένας μη ειδικός δείκτης δυσλειτουργίας του ποδοκυττάρου [53]. Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα το ποδοκύτταρο είναι ένα κύτταρο ευαίσθητο στην ινσουλίνη, που αποκρίνεται στην εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης εντός λίγων λεπτών με την πρόσληψη γλυκόζης [54]. Η κινητική αυτής της απόκρισης είναι παρόμοια με εκείνη των μυϊκών κυττάρων, ενισχύοντας την παρατήρηση ότι τα ποδοκύτταρα παρουσιάζουν χαρακτηριστικά των εξειδικευμένων λείων μυϊκών κυττάρων, με ταχεία συσταλτικότητα in vitro [36]. Πιθανά, η συσταλτική απόκριση των ποδοκυττάρων στις ενδοτριχοειδικές πιέσεις να απαιτεί την ταχεία παροχή ενέργειας με τη μορφή γλυκόζης. Μάλιστα, αυτή η απόκριση στην ινσουλίνη φαίνεται να εξαρτάται από τη νεφρίνη με τα ποδοκύτταρα με έλλειψη νεφρίνης εμφανίζουν κυτταρική αντίσταση στην ινσουλίνη. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασημεταξύ νεφρίνης και της πρωτεΐνης VAMP2 (vesicle associated membraneprotein), μια πρωτεΐνη σημαντική για τη μεταφορά του GLUT4 μεταφορέα γλυκόζης.

- **Η νεφρίνη είναι σηματοδοτικό μόριο**

Η νεφρίνη πέρα από τη σημασία της ως δομικό μόριο, παίζει ρόλο-κλειδί στη διακυττάρια επικοινωνία.

Όπως προαναφέρθηκε, η νεφρίνη ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινικών μορίων κυτταρικής προσκόλλησης ICAM (Ig Cellular Adhesion Molecule). Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης συμβάλλουν εκτός από την μηχανική σύνδεση των κυττάρων, στην επικοινωνία μεταξύ τους καθώς και στην επικοινωνία κυττάρων και

θεμέλιας ουσίας. Τα σήματα αυτά είναι σημαντικά για την διατήρηση της πρόσφυσης, την κινητικότητα, την αύξηση και επιβίωση των κυττάρων.

Η νεφρίνη σε συνδυασμό με άλλες ποδοκυτταρικές πρωτεϊνες όπως η CD2AP και η ποδοσίνη ρυθμίζει μια σειρά κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής μελών της οικογένειας των MAP (mitogen-activated protein) κινασών και την ενεργοποίηση του μονοπατιού της 3-OH κινάσης των φωσφοϊνοσιτιδίων [Phosphoinositide (PI) 3 kinase] [55, 56].

Ως ρυθμιστής της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, η νεφρίνη στρατολογεί μα σειρά άλλων πρωτεϊνών, όπως την κινάση PI 3, την κινάση Fyn της οικογένειας Src και τη φωσφολιπάση Cγ 1 στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων συνδέοντας τις στο καρβοξυτελικό άκρο της.

Στην πραγματικότητα, η σύνδεση αυτών των πρωτεϊνών με τη νεφρίνη είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, καθώς μαζί με τη διάδραση της με το CD2AP αποτελούν τα καθοριστικά βήματα μέσω των οποίων η νεφρίνη ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό του ποδοκυττάρου.

Η περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης όπου βρίσκεται η νεφρίνη είναι φτωχή σε χοληστερόλη. Ένα μικρό ποσοστό της νεφρίνης εντοπίζεται σε περιοχές πλούσιες σε χοληστερόλη και γαγγλιοσίδια στην κορυφαία επιφάνεια των ποδικών εκβλαστήσεων, όπου μαζί με την CD2AP συνδέεται στον κυτταροσκελετό. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται «λιπιδικές σχεδίες» και περιέχουν ομάδες πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην μετάδοση σημάτων προς το κύτταρο. Χορήγηση του αντισώματος 27A έναντι της GD3 γαγγλιοσίδης που εντοπίζεται στις λιπιδικές σχεδίες, προκαλεί πρωτεϊνουρία και τυροσινική φωσφορυλίωση της νεφρίνης [57]. Το ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης φωσφορυλιώνεται από κινάσες της οικογενείας src όπως η κινάση Fyn και Yes, που καθιζάνουν μαζί με τη νεφρίνη κατά τον

κλασματικό διαχωρισμό των λιπιδικών σχεδιών. Η απαλοιφή της Fyn κινάσης σε ποντίκια, προκαλεί μεταβολές στη μορφολογία των ποδικών προσεκβολών [58].

3.6.2 Ποδοσίνη

Η ποδοσίνη (NPHS2) είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 42 Kda σε σχήμα φουρκέτας καθώς το NH2-τελικό και COOH-τελικό άκρο της βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα όπως όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας των στοματινών-καβεολινών [59, 60]. Εντοπίζεται στο σημείο αγκυροβολήσεως του ΛΔ στην κυτταρική μεμβράνη. Ολιγομερή της ποδοσίνης εντοπίζονται σε «λιπιδικές σχεδίες» όπου μέσω του COOH-τελικού τους άκρου συνδέονται με τη νεφρίνη και την CD2AP [61]. Επίσης το COOH-τελικό της άκρο συνδέεται με την NEPH-1, μια πρωτεϊνη του ΛΔ, δομικά παρόμοια με τη νεφρίνη [62]. Η NEPH-1 αλληλεπιδρά με τη νεφρίνη και συμμετέχει στη δομική ακεραιότητα του ηθμού διήθησης [63].

Η έκφραση και λειτουργία της ποδοσίνης βρίσκεται σε άμεση συνάφεια με τη νεφρίνη. Για την ακρίβεια αλληλεπιδρά άμεσα με τη νεφρίνη, διευκολύνοντας την είσοδο της δεύτερης σε εξειδικευμένες λιπιδικές μικροπεριοχές της πλασματικής μεμβράνης [55, 61]. Επίσης συμμετέχει στην ενδοκυτταρική μεταφορά της νεφρίνης, καθώς μεταλλάξεις της ποδοσίνης οδηγούν σε την εσφαλμένη εντόπιση της νεφρίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο αντί της πλασματικής μεμβράνη [55]. Μεταλλάξεις ποδοσίνης έχουν βρεθεί σε 20-30% των ασθενών που παρουσιάζουν νεφρωσικό σύνδρομο ανθεκτικό σε στεροειδή στην παιδική ηλικία [64, 65].

Η δυσλειτουργία της ποδοσίνης οδηγεί σε μεταβολές στο σχηματισμό του ΛΔ και σε λευκωματινουρία σε πειραματικά μοντέλα. Ποντίκια με πλήρη εξάλειψη της λειτουργίας του γονιδίου NPHS2 (NPHS2 -/-) αναπτύσσουν πρωτεϊνουρία και μαζική μεσαγγειακή σκλήρυνση (διαφορετική από εκείνη στην εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση στον άνθρωπο), ενώ τα ποδοκύτταρα είναι μεγαλύτερα σε

μέγεθος με κενοτοπιώδη εμφάνιση [66]. Η σκλήρυνση εξελίσσεται ταχέως με την ηλικία. Στις ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις ταυτόχρονα, παρατηρείται και απουσία νεφρίνης. Τα ποντίκια αυτά πεθαίνουν λίγες ημέρες μετά τη γέννηση.

3.6.3 CD2AP (CD2-associated protein)

Η πρωτεΐνη αυτή εντοπίστηκε αρχικά στην πλασματική μεμβράνη των Τ-λεμφοκυττάρων και κυττάρων φυσικών φονέων (NK), όπου παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπιδραση με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [67].

Στο νεφρό εντοπίζεται στα ποδοκύτταρα και σε κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου και του αθροιστικού σωληναρίου. Στα ποδοκύτταρα η CD2AP συνδέεται με τη νεφρίνη, την ακτίνη, την α-ακτινίνη4, τη συναπτοποδίνη και τις πρωτεΐνες δεματοποίησης της ακτίνης κορτακτίνη και ARP2/3 [68-71].

Σε ποντίκια με εξάλειψη της λειτουργίας του γονιδίου της CD2AP παρατηρείται λευκωματινουρία και νεφρική ανεπάρκεια [72]. Κατά την γέννηση δεν παρατηρούνται διαταραχές στο σχηματισμό των ποδικών εκβλαστήσεων και του ΛΔ, αλλά με την πάροδο του χρόνου τα ποντίκια χάνουν σταδιακά την νεφρίνη από τα περισσότερα σπειράματα. Από την πρώτη εβδομάδα μετά τη γέννηση παρατηρείται απώλεια των ποδικών εκβλαστήσεων με την σπειραματική βλάβη να εξελίσσεται ταχέως με υπερπλασία του μεσαγγείου, σκλήρυνση των σπειραμάτων και νεφρική ανεπάρκεια που οδηγεί στο θάνατο των ζώων γύρη στην 6η με 7η εβδομάδα.

3.6.4 ZO-1

Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών MAGUK (membrane associated guanylate kinase) και εκφράζεται κυρίως στις ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο επίπεδο του ΛΔ. Παίζει ρόλο

στην κυτταρική επικοινωνία και στην οργάνωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά των διακυτταρικών συνδέσμων όπως η οκλουντίνη (occludin), η α-κατενίνη και η ZO-2 καθώς και με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όπως η ακτίνη και σπεκτρίνη.

3.6.5 FAT

Οι πρωτεινες FAT συνιστούν μια οικογένεια γιγάντιων πρωτοκαντερινών (protocadherins) και περιέχουν 34 διαδοχικές εξωκυττάριες επαναλήψεις τύπου καντερίνης. Η FAT1 εντοπίζεται μαζί με τη νεφρίνη στη βάση του ΛΔ [73], το δε ενδοκυττάριο τμήμα της συνδέεται με την ZO-1. Σε αντίθεση με την P-καντερίνη, FAT1 είναι ένα βασικό συστατικό του το φραγμού διήθησης. Η FAT1 συνδέεται με την πρωτεινη Ena / VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) και συμμετέχει στη δυναμική της ακτίνης και την κυτταρική πολικότητα [74]. Ποντίκια με πλήρη έλλειψη FAT1 (FAT1-null) εμφανίζουν περιγεννητική θνησιμότητα που προκαλείται από την απώλεια του ΛΔ στο σπείραμα και εξάλειψη των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων [75]. Ο ακριβής ρόλος των πρωτεϊνών FAT διατήρηση του φραγμού σπειραματικής διήθησης μένει να προσδιοριστεί περαιτέρω.

3.6.6 P-καντερίνη

Είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη με 5 εξωκυττάρια διαδοχικά μόρια καντερίνης και ένα ενδοκυττάριο τμήμα που συνδέεται στην β- και γ-κατενίνη. Το σύμπλεγμα αυτό συνδέεται στην α-κατενίνη και μέσω αυτής στην στη ZO-1 ή/και α-ακτινίνη4 συμβάλλοντας έτσι στη σύνδεση του ΛΔ στον κυτταροσκελετό. Ένα μόριο P-καντερίνης συνδέεται με το αντίστοιχο του στην απέναντι ποδική εκβλάστηση, γεφυρώνοντας την διαφραγματική σχισμή και σχηματίζουν τον πυρήνα πάνω στον

οποίο χτίζεται το ΛΔ [76]. Ωστόσο, η έκφραση της P-καντερίνης δεν φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία του ΛΔ καθώς σε knock-out για την P-καντερίνη ποντίκια δεν εμφανίζεται νεφρωσικό σύνδρομο [77].

3.6.7 NEPH1

Οι πρωτεΐνες Neph (Neph1, Neph2 andNeph3) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών Ig με δομή παρόμοια με εκείνη της νεφρίνης. Η Neph1 είναι ζωτικής σημασίας για την ακεραιότητα του ΛΔ, αφού ποντίκια με έλλειψη Neph1 εμφανίζουν πρωτεϊνουρία και πεθαίνουν πριν από την ηλικία των 8 εβδομάδων [78]. Οι εξωκυτταρικές περιοχές των Neph1 και Neph2 σχηματιζουν ετεροδιμερή με τη νεφρίνη και τη μορφή ομοδιμερή μεταξύ τους [79]. Επιπλέον, όλες οι τρεις πρωτεΐνες Neph μπορούν να συνδεθούν με τις πρωτεΐνες του ΛΔ ποδοσίνη και ZO-1 [62, 80]. Οι πρωτεΐνες Neph μπορεί επομένως να λειτουργούν ως συνδέτες για τη νεφρίνη ή μεταξύ τους εντός του επιπέδου του ΛΔ και να συμμετέχουν σε μονοπάτια σηματοδότησης από το εξωτερικό προς το εσωτερικό.

3.6.8 TRPC6 (Transient receptor potential cation channel C6)

Η TRPC6 είναι μέρος της οικογένειας TRP (Transient receptor potential cation channel) καναλιών. Η TRPC6 ανήκει σε μια υποομάδα καναλιών διαπερατά από ασβέστιο που είναι υπεύθυνα για την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου μετά ενεργοποίηση των GPCR (G-protein coupled receptors) υποδοχέων και υποδοχέων τυροσινικής κινάσης. Φαίνεται ότι η TRPC6 αλληλεπιδρά άμεσα με πρωτείνες του ΛΔ όπως η νεφρίνη και η ποδοσίνη [81]. Μεταλλάξεις της TRPC6 προκαλούν την αυτοσωματική επικρατή μορφή της εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης [81, 82].

3.7. Πρωτεΐνες της βασικής επιφάνειας - μόρια πρόσφυσης

Οι ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις "αγκυροβολούν" στην υποκείμενη ΣΒΜ μέσω διαμεμβρανικών μορίων πρόσφυσης. Οι επαφές αυτές ποδοκυττάρου-στρώματος βοηθούν στη διατήρηση της δομής των ποδοειδών προεκβολών. Μεταλλάξεις σε συστατικά της ΣΒΜ όπως κολλαγόνο IV και λαμινίνη ή ελλείμματα στην έκφραση μορίων προσκόλλησης των ποδοκυττάρων (ιντεγκρίνες α3β1 και α- και β-δυστρογλυκάνη) μπορούν να οδηγήσουν σε τραυματισμό ή απώλεια ποδοκυττάρου και ανεπάρκεια του φραγμού διήθησης.

3.7.1 Ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην προσκόλληση των κυττάρων στη θεμέλιο ουσία. Αποτελούνται από α και β υπομονάδες και κάθε κυτταρικός τύπος εκφράζει χαρακτηριστικό συνδυασμό αυτών. Η πιο σημαντική ιντεγκρίνη που εκφράζεται στη βάση των ποδοειδών εκβλαστήσεων είναι η α3β1. Αυτή μπορεί να συνδεθεί με κολλαγόνο-IV, φιμπρονεκτίνη, λαμινίνη και εντακτίνη. Η σύνδεση των διμερών της ιντεγκρίνης με τα συστατικά της ΣΒΜ επάγει την εστιακή συνάθροιση των μορίων ιντεγκρίνης, με τρόπο ώστε να σχηματίζονται εστιακές προσφύσεις στην κυτταρική μεμβράνη. Εκεί συγκλίνουν ενδοκυττάριες πρωτεΐνες (παξιλλίνη, ταλίνη, βινκουλίνη, α-ακτινίνη 4) οι οποίες συνδέονται στη β1 υπομονάδα της ιντεγκρίνης και στο κυτταροσκελετό της ακτίνης.

Η χορήγηση αντισώματος έναντι της β1 ιντεγκρίνης σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών οδήγησε στην ανάπτυξη της πρωτεϊνουρίας, τη σύντηξη των ποδοειδών εκβλαστήσεων και την αποκόλληση των ποδοκυττάρων από τη ΣΒΜ [83].

Η πλήρης απώλεια του γονιδίου της α3 ιντεγκρίνης σε πειραματικά μοντέλα οδηγεί στην αδυναμία σχηματισμού ώριμων ποδοειδων εκβλαστήσεων, ενώ αντίστοιχα η απώλεια του γονιδίου της β1 ιντεγκρίνης οδηγεί σε πρώιμο ενδομήτριο θάνατο [84, 85].

Η έκφραση της ιντεγκρίνης μελετήθηκε σε διάφορες σπειραματοπάθειες με πρωτεϊνουρία αλλά τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά. Ένα γενικό συμπέρασμα που βγαίνει από τις μελέτες αυτές είναι ότι δεν αλλάζει η ποσοτική έκφραση της ιντεγκρίνης, αλλά μάλλον τροποποιείται η λειτουργία της ως μόριο μετάδοσης σημάτων από και προς το ποδοκύτταρο.

3.7.2 Δυστρογλυκάνη

Συστατικά του συμπλέγματος δυστρογλυκάνης εκφράζονται στο βασική κυτταρική μεμβράνη των ποδοειδών εκβλαστήσεων. Το σύμπλεγμα δυστρογλυκάνης παρέχει ένα σύνδεσμο μεταξύ της υποκείμενης εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας και του κυτταροσκελετού. Η προσβολή του ποδοκυττάρου μέσω παραγωγής ριζών οξυγόνου οδηγούν στη διακοπή των συνδέσεων μεταξύ της α - δυστρογλυκάνης και θεμέλιας ουσίας και αποδιοργάνωση της ΣΒΜ [86, 87].

3.7.3 Κινάση συνδεόμενη με ιντεγκρίνη (ILK)

Η ILK είναι κινάση σερίνης-θρεονίνης που συνδέεται στο κυτταροπλασματικό άκρο της β1-ιντεγκρίνης. Η σύνδεση της ιντεγκρίνης σε φυσιολογικά συστατικά της βασικής μεμβράνης καταστέλλει την κινάση αυτή, ενώ η σύνδεση σε παθολογικά συστατικά (π.χ κολλαγόνο τύπου Ι) την επάγει. Έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη αυτή υπερκφράζεται στα σπειράματα παιδιών με CNF.

Η ILK συμμετέχει στην επικοινωνία μεταξύ της βασικής και πλαγίας επιφάνειας των ποδίσκων προκαλώντας αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Φαινοτυπικά προκαλεί αλλαγή των ποδοκυττάρων από διαφοροποιημένα κύτταρα με εκβλαστήσεις σε αδιαφοροποίητα κύτταρα χωρίς εκβλαστήσεις και χωρίς ΛΔ.

Επομένως, η κινάση αυτή και γενικότερα ο μηχανισμός πρόσφυσης, εμπλέκεται όχι μόνο στην κυτταρική επικοινωνία και στήριξη αλλά και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, η χρησιμοποίηση αναστολέων κινασών σερίνης-θρεονίνης ευνοεί την ανάπτυξη εκβλαστήσεων σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων.

Εκτός από το CNF, αυξημένη έκφραση της ILK έχει βρεθεί και σε πειραματικά μοντέλα σπειραματοπάθειας με πρωτεϊνουρία (διαβητική, αντι-GBM κλπ).

3.8 Ο κυτταροσκελετός

Η μοναδική αρχιτεκτονική του ποδοκυττάρου επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό μέσα από τον κυτταροσκελετό του. Οι δέσμες ινιδίων ακτίνης στις ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις ευθύνονται για τη διατήρηση του σχήματος των κυττάρων και το ΛΔ στην πλάγια επιφάνεια των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων. Επιπλέον, ο κυτταροσκελετός φαίνεται να συμβάλλει στην εξουδετέρωση των διατατικών δυνάμεων στο τοίχωμα των τριχοειδών. Για την πραγματοποίηση αυτών των ρόλων, ο κυτταροσκελετός πρέπει να παρέχει μια ισορροπία μεταξύ δομικής σταθερότητας και ευκαμψίας, προκειμένου το ποδοκύτταρο να αντιμετωπίσει τις μεταβολές στην ενδοσπειραματική τριχοειδική πίεση, αλλά και να αποκρίνεται σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα.

3.8.1 Συναπτοποδίνη

Η συναπτοποδίνη είναι μία συνδεόμενη με την ακτίνη πρωτεΐνη, που εκφράζεται στις ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις και τελεγκεφαλικούς δενδρίτες [88]. Η παρατήρηση ότι η συναπτοποδίνη εκφράζεται σε περιοχές υψηλής συναπτικής πλαστικότητας στον εγκέφαλο, μαζί με τα αποτελέσματα από καλλιέργειες κύτταρων, υποδεικνύουν ότι η συναπτοποδίνη μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του σχήματος και της κινητικότητας των κυττάρων μέσω της ακτίνης.

Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με πλήρη έλλειψη συναπτοποδίνης δεν έχουν την νωτιαία δενδριτική συσκευή, χωρίς μεταβολές στη μικροδομή των ποδοκυττάρων [89]. Ωστόσο, τα ποδοκύτταρα σε αυτά τα πειραματικά μοντέλα παρουσίασαν χαμηλό βαθμό ανάρρωσης μετά από χημικά επαγόμενη εξάλειψη των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων, υποδεικνύοντας ένα έλλειμμα στη δυναμική του κυτταροσκελετού του ποδοκυττάρου. Αντίστοιχα, η γονιδιακή σίγηση της συναπτοποδίνης σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων προκάλεσε απώλεια του σχηματισμού φιλοποδίων και διαταραχή της κυτταρικής μετανάστευσης υποδεικνύοντας το ζωτικό ρόλο της συναποτοποδίνης στη δυναμική του κυτταροσκελετου και την ποδοκυτταρική μετανάστευση [90].

3.8.2 F-ακτίνη (πολυμερής ακτίνη)

Η F-ακτίνη αποτελεί μια εξαιρετικά δυναμική δομή, καθώς μπορεί να μεταβάλλεται ταχύτατα με προσθήκη ή αφαίρεση μονομερών ακτίνης. Έτσι τα ινίδια αυτά μπορούν να αυξάνονται σε μήκος, να διακλαδίζονται ή/και να αποσυναρμολογούνται. Μπορούν να σχηματίζουν χαλαρό δίκτυο ή παράλληλα δεμάτια με τη βοήθεια πρωτεϊνών δεματοποίησης. Τα δεμάτια αυτά σχηματίζουν αγκύλες που διατρέχουν

κατά μήκος τις ποδικές εκβλαστήσεις. Οι δυο άκρες της αγκύλης συνδέονται στο πέλμα δύο διαδοχικών ποδίσκων με τις πρωτεΐνες αγκυροβόλησης και η κορυφή της συνδέεται στην ρίζα των ποδίσκων με τους μικροσωληνίσκους και τα ενδιάμεσα ινίδια των πρωτογενών εκβλαστήσεων. Η κινητήρια πρωτεΐνη μυοσίνη επιτρέπει την ισομετρική ή ισοτονική σύσπαση των ινιδίων στα κύτταρα.

3.8.3 α-ακτινίνη-4

Η α-ακτινίνη-4 εκφράζεται στις ποδοειδείς εκβλαστήσεις και συμβάλλει στη σύνδεση-δεματοποίηση των ινιδίων της ακτίνης. Στο πειραματικό νεφρωσικό σύνδρομο από πουρομικίνη, παρατηρείται σημαντική επαγωγή της α-ακτινίνης και αποδιάταξη των ινιδίων της ακτίνης πριν την σύντηξη των εκβλαστήσεων [91].

Μεταλλάξεις του γονιδίου της σχετίζονται με την ανάπτυξη οικογενούς εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης όψιμης έναρξης, που μεταβιβάζεται κατά τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα [92]. Ένα υποσύνολο μεταλλάξεων που σχετίζονται με εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης εντοπίζονται λίγο έξω από την περιοχή σύνδεσης της ακτίνης και αυξάνουν τη συγγένεια της α-ακτινίνης-4 για την ακτίνη, υποδηλώνοντας ότι ο κυτταροσκελετός ποδοκυττάρου μπορεί να απορρυθμισθεί. Η έκφραση ενός τέτοιου αλληλόμορφου υψηλής συγγένειας της α-ακτινίνης-4 σε πειραματικά μοντέλα οδηγεί στην εξάλειψη των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων, ανάπτυξη λευκωματινουρίας, και σπειραματική σκλήρυνση [93]. Όπως φαίνεται από καλλιέργειες ποδοκυττάρων, η αυξημένη συγγένεια για την ακτίνη αλλάζει την εντόπιση της ακτινίνη-4 στα κύτταρα γεγονός που διαταράσσει τη δυναμική του κυτταροσκελετού και την κινητικότητα των ποδοκυττάρων [94]

3. 9 Άλλα ποδοκυτταρικά μόρια

Εκτός από τα πολυάριθμα συστατικά του ΛΔ, τα μόρια προσκόλλησης και τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, έχουν περιγραφεί πολλές ακόμη πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη μορφή και τη λειτουργία του ποδοκυττάρου. Πολλές από αυτές εκφράζονται στην κορυφαία μεμβράνη των ποδοκυττάρων και της λειτουργίας τους ποικίλλει από τη δημιουργία ενός φορτισμένου γλυκοκάλυκα ως ενδοκυτταρική σηματοδότηση.

3.9.1 Ποδοκαλυξίνη

Η ποδοκαλυξίνη είναι η κύρια σιαλογλυκοπρωτεϊνη που εκφράζεται σε ποδοκύτταρα και είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια του ποδοκυττάρου [94]. Η πρωτεΐνη αυτή είναι έντονα γλυκοζυλιωμένη από υδατάνθρακες πλούσιους σε θειικές ομάδες και σιαλικό οξύ που προσδίδουν το αρνητικό φορτίο. Το αρνητικό φορτίο της ποδοκαλυξίνης βοηθά στην απώθηση των πρωτεϊνών διά της ΣΒΜ, ενώ ταυτόχρονα διαχωρίζει τις παρακείμενες ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις μεταξύ τους. Το κυτταροπλασματικό τμήμα της ποδοκαλυξίνης αλληλεπιδρά με δύο κυτταροπλασματικές συνδετικές πρωτεΐνες, την εζρίνη και η NHERF2 (Na^+/H+ exchanger-regulatory factor 2: ρυθμιστικός παράγοντας του ανταλλάκτη Na^+/H^+), παρέχοντας μια σύνδεση με το κυτταροσκελετό [95]. Η διακοπή αυτών των αλληλεπιδράσεων οδηγεί σε αλλαγές στη δομή των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων.

Επιπλέον, τα ποδοκύτταρα σε ποντίκια knock out για το γονίδιο της ποδοκαλυξίνης, αποτυγχάνουν να σχηματίσουν ποδοειδείς εκβλαστήσεις και το ΛΔ αντικαθίσταται από στενές συνδέσεις, με τα ποντίκια να πεθαίνουν εντός 24 ωρών από τη γέννησή τους [96]. Η ποδοκαλυξίνη επίσης ενεργοποιεί την RhoA, μια μικρή

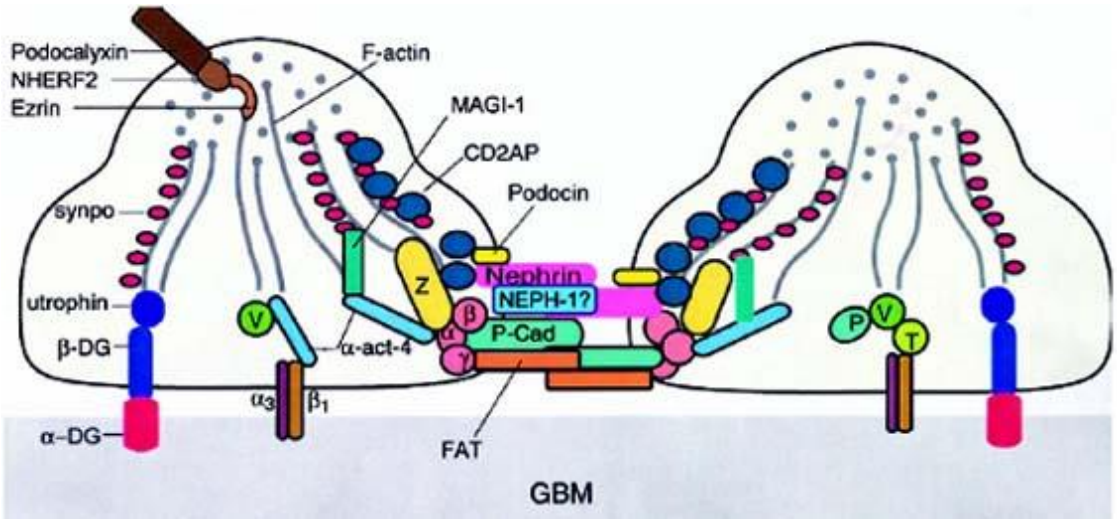
- GTPάση, μέσω του NHERF και της εζρίνης, οδηγώντας σε ανακατανομή των νηματίων ακτίνης.

Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η ποδοκαλυξίνη είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του φραγμού διήθηση και ότι μπορεί να μεσολαβήσει στη μετάδοση σημάτων, που αφορούν την οργάνωση του κυτταροσκελετού των ποδοειδών εκβλαστήσεων.

3.9.2 WT1 (Wilms' tumour suppressor 1)

Η πρωτεΐνη WT1 είναι ένας βασικός μεταγραφικός παράγοντας για τη λειτουργία ποδοκυττάρου, καθώς είναι απαραίτητος για την ωρίμανση ποδοκυττάρου, αλλά εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και στην ενήλικη ζωή. Φαίνεται μεταξύ άλλων να είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της έκφρασης της ποδοκαλυξίνης και της νεφρίνης [97, 98]. Επικρατείς μεταλλάξεις στο γονίδιο του WT1 προκαλούν το σύνδρομο Denys - Drash και Frasier, που χαρακτηρίζονται από προοδευτική σπειραματοπάθεια και αρσενικό ψευδοερμαφροδιτισμό. Η πλήρης απουσία της λειτουργίας του γονιδίου σε ποντίκια οδηγεί σε ενδομήτριο θάνατο λόγω νεφρικής ανεπάρκειας του νεφρού και μη ανάπτυξης γονάδων.

Ετεροζυγωτικά ποντίκια (WT1 +/-) εμφανίζονται φυσιολογικά κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής, αλλά αναπτύσσουν νεφρωσικό σύνδρομο με μεσαγγειακή σκλήρυνση κατά την ενηλικίωση [99]. Το γονίδιο WT1 είναι πολύ σύνθετο, καθώς με εναλλακτικές θέσεις έναρξης, εναλλακτικό μάτισμα και επεξεργασία του RNA μπορεί να οδηγήσει σε τουλάχιστον 24 διαφορετικές ισομορφές και η απουσία ή μειωμένη λειτουργία κάποιων εξ αυτών σχετίζεται με πρώιμο θάνατο [100].



Εικόνα 5. Εγκάρσια τομή ΛΔ που συνδέει δύο γειτονικές ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις. Διακρίνεται η πλάγια επιφάνεια με τις πρωτεΐνες του ΛΔ, η βασική επιφάνεια σε επαφή με τη ΣΒΜ και η κορυφαία επιφάνεια με την αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη ποδοκαλυξίνη. Οι 3 επιφάνειες συνδέονται ανατομικά και λειτουργικά μεταξύ τους μέσω του κυτταροσκελετού. Από Mundel P and Shankland SJ [101].

Υπάρχει πληθώρα άλλων ποδοκυτταρικών μορίων εκ των οποίων η λειτουργία των οποίων παραμένει να άγνωστος ή μένει να προδιορισθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η περιγραφή των οποίων διαφεύγει του σκοπού του παρόντος συγγράμματος.

4. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η ΔΝ παθολογοανατομικά χαρακτηρίζεται από πάχυνση της σπειραματικής και σωληναριακής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ), προοδευτική αύξηση της μεσαγγείου ουσίας που οδηγεί σταδιακά στη μείωση της επιφάνειας για διήθηση. Παράλληλα συμβαίνουν μεταβολές στο σωληναροδιάμεσο ιστό όπως ίνωση καθώς και

υαλινοποίηση των αρτηριδίων. Η αύξηση του μεσαγγείου μπορεί να είναι διάχυτη (διαβητική σπειραματοσκλήρυνση) ή με περιοχές περισσότερο εκσεσημασμένης πάχυνσης σχηματίζοντας στρογγυλόμορφες ινιδώδεις ζώνες με πυρήνα (οζώδης σπειραματοσκλήρυνση - Kimmelstiel-Wilson nodes) [102].

4.1 Σπειραματική βλάβη

Με βάση τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του σπειράματος η ΔΝΝ ή διαβητική σπειραματοπάθεια ταξινομείται σε 5 υποκατηγορίες (Πίνακας 2) [103]. Όσον αφορά το πάχος της ΣΒΜ που όπως φαίνεται αποτελεί σημαντικό διαγνωστικό κριτήριο ιστολογικά, οι τιμές που χρησιμοποιούνται είναι ενδεικτικές και βασίζονται στην απόκλιση από το φυσιολογικό πάχος ΣΒΜ κατά δύο τυπικές αποκλίσεις όπως περιγράφηκες από τον Haas [104]. Ουσιαστικά, αυτό το όριο μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις μεθόδους μέτρησης που χρησιμοποιούνται για το πλάτος της ΣΒΜ και συνήθως κάθε εργαστήριο θέτει τα κατώτερα όρια μέτρησης.

4.2 Σωληναριακή βλάβη

Η πάχυνση της σωληναριακής βασικής μεμβράνης των μη ατροφικών σωληναρίων είναι εμφανής ήδη από το στάδιο ΙΙ διαβητικής σπειραματοπάθειας και εξελίσσεται κατα τα επόμενα στάδια. Η διάμεση ίνωση και ατροφία των σωληναρίων (Interstitial fibrosis and tubular atrophy - IFTA) ακολουθούν τις αλλοιώσεις στο σπείραμα της κατηγορίας Ι ΔΝΝ Ν που τελικά οδηγούν σε νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Η IFTA βαθμολογείται ανάλογα με το ποσοστό της επιφάνειας διάμεσου ιστού και σωληναρίων που συμμετέχουν [103] (Πίνακας 3).

Ως 0 βαθμολογείται εκχωρείται βαθμολογία από 0 όταν το παρασκεύασμα της βιοψίαε δεν παρουσιάζει IFTA , με 1 βαθμολογείται, όταν παρατηρείται IFTA σε

λιγότερο από 25 % είναι, με 2 όταν σε υπάρχει IFTA σε τουλάχιστον 25% αλλά λιγότερο από το 50 % ω του δείγματος, και, τέλος , με 3 βαθμολογείται όταν τουλάχιστον το 50% IFTA είναι παρούσα. Η παρουσα ταξινόμηση - βαθμολόγηση προσομοιάζει με την κατάταξη των IgA νεφροπάθεια [105]. Επιπροσθέτως, η παρουσία μονοπύρηνων κυττάρων στο διάμεσο ιστό είναι ένα ευρέως αναγνωρισμένο εύρημα στη ΔΝΝ. Οι φλεγμονώδεις διάμεσες διηθήσεις περιλαμβάνουν Τ λεμφοκύτταρα και μακροφάγα.

4.3 Αγγειακή βλάβη

Η υαλινοποίηση του απαγωγού αρτηριδίου αποτελεί σχετικά ειδικό εύρημα της ΔΝΝ, αλλά όσον αφορά στο προσαγωγό αρτηρίδιο, μπορεί να συμβαίνει σε διάφορες άλλες καταστάσεις (πχ. νεφροπάθεια από κυκλοσπορίνη, στεφανιαία νόσο σε νέα άτομα) [106-108]. Η υαλινοποίηση του απαγωγού αρτηριδίου χαρακτηριστικά διαφοροποιεί τη ΔΝΝ από την υπερτασική νεφροπάθεια. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται γενικά στην υαλινοποίηση των αρτηριδίων χωρίς να διακρίνουν μεταξύ απαγωγού και προσαγωγού και τη συσχετίζουν με κλινικές παραμέτρους όπως η λευκωματινουρία και η εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, στο νεφρικό παρασκεύασμα αξιολογείται και η παρουσία αθηροσκλήρωσης με τη χρήση της αναλογίας "στρώμα προς μέσο χιτώνα" η οποία φαίνεται να είναι αυξημένη σε ασθενείς με λευκωματινουρία.

Πίνακας 2: Ιστοπαθολογική ταξινόμηση της ΔΝΝ με βάσει τα ευρήματα στο σπείραμα

Κατηγορία	Χαρακτηριστικά	Κριτήρια
I	Ήπιες ή μη ειδικές αλλοιώσεις στο ΦΜ και πάχυνση της ΣΒΜ στο ΗΜ	Βιοψία που δεν πληροί τα κριτήρια για τις κατηγορίες II - IV ΣΒΜ> 395 nm σε θήλυ ή > 430 nm σε άρρεν άτομο ηλικίας > 9 ετών
IIa	Ήπια αύξηση του μεσαγγείου	Βιοψία που δεν πληροί τα κριτήρια για τις κατηγορίες III - IV Ήπια αύξηση του μεσαγγείου σε > 25% του εξεταζομένου μεσαγγείου
IIb	Σημαντική αύξηση του μεσαγγείου	Βιοψία που δεν πληροί τα κριτήρια για τις κατηγορίες III - IV Σημαντική αύξηση του μεσαγγείου σε > 25% του εξεταζομένου μεσαγγείου
III	Οζώδης σκλήρυνση Kimmelstiel-Wilson	Βιοψία που δεν πληροί τα κριτήρια για την κατηγορία IV Τουλάχιστον 1 βλάβη Kimmelstiel-Wilson
IV	Προχωρημένη διαβητική σπειραματοσκλήρυνση	Διάχυτη σπειραματική σκλήρυνση σε > 50% των σπειραμάτων Αλλοιώσεις τύπου I έως III

ΦΜ: Φωτονικό μικροσκόπιο, ΗΜ: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ΣΒΜ: Σπειραματική βασική μεμβράνη

Πίνακας 3: Ευρήματα διάμεσου ιστού και αγγείων στη ΔΝΝ

Κατηγορία	Κριτήρια	Σκορ
Διάμεσες βλάβες		
-IFTA	Απουσία IFTA <25% 25% - 50% > 50%	0 1 2 3
-Διάμεση φλεγμονή	Απουσία Διήθηση σε περιοχές IFTA Διήθηση ανεξαρτήτως IFTA	0 1 2
Αγγειακές βλάβες		
-Υαλινοποίηση των αρτηριδίων	Απουσία Τουλάχιστον 1 περιοχή > 1 περιοχή	0 1 2
-Αρτηριοσκλήρωση μεγάλων αγγείων	Χωρίς πάχυνση του έσω χιτώνα Πάχυνση του έσω χιτώνα < μέσου Πάχυνση του έσω χιτώνα > μέσου	0 1 2

Ωστόσο, συνυπάρχει βλάβη των ποδοκυττάρων του σπειράματος. Άλλωστε, τα ποδοκύτταρα έχουν αναγνωριστεί ως ο παθοφυσιολογικός στόχος στην πλειοψηφία των πρωτεινουρικών νεφροπαθειών [109]. Σύμφωνα με τα έως τώρα δεδομένα, θεωρείται ότι η εξάλειψη των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων όχι μόνο είναι αναστρέψιμη στα πρώιμα στάδια [110], αλλά είναι και ζωτικής σημασίας για την επιβίωση υγιών ποδοκυττάρων στο σπείραμα [111]. Η ποδοκυτταρική βλάβη στη ΔΝΝ θα περιγραφεί αναλυτικότερα σε μετέπειτα ενότητα του παρόντος συγγράμματος.

5. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η ανάπτυξη της ΔΝΝ οφείλεται σε μια σειρά παραγόντων:

5.1 Αιμοδυναμικοί παράγοντες

Είναι γνωστό ότι οι αιμοδυναμικές μεταβολές εντός του σπειράματος αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι της παθοφυσιολογίας της ΔΝΝ στα πρώιμα κιόλας στάδια. Η μείωση της αντίστασης του προσαγωγού και απαγωγού αρτηριδίου με το προσαγωγό να παραμένει περισσότερο διεσταλμένο, έχει σαν αποτέλεσμα την υπερδιήθηση και αυξημένες ενδοσπειραματικές πιέσεις. Σε αυτές τις μεταβολές οδηγούν μια σειρά από παράγοντες όπως τα προστανεοιδή, το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το κολπικό νατριουρητικό περπτίδιο, η αυξητική ορμόνη, η γλυκαγόνη, η αγγειοτενσινη. Οι παραπάνω μεταβολές και το ακόλουθο μηχανικό στρες δεν μπορεί παρά να αποτελεί σημαντική συνιστώσα και της ποδοκυτταρικής βλάβης καθ' αυτής. Η έκθεση ποδοκυττάρων (σε καλλιέργειες) σε διατμητικές δυνάμεις ενεργοποιεί συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια και έκκριση κυτοκινών [112].

5.2 Μεταβολικοί παράγοντες

Τα μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ΔΝΝ περιγράφηκαν από τον Brownlee το 2001 [113]. Κοινή αρχή όλων αποτελεί η υπεργλυκαιμία που οδηγεί σε αυξημένη γλυκόλυση και στη συνέχεια ενεργοποιεί τέσσερα μονοπάτια: των πολυολών, των εξοζαμινών, την παραγωγή προϊόντων γλυκοζυλίωσης και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C.

5.2.1 Τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης

Τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End-Products; AGE) σχηματίζονται στο ΣΔ μετά από διάδραση της γλυκόζης με πρωτεϊνικά και λιπιδικά μόρια και έχουν τοξική δράση σε όλο τον οργανισμό συμπεριλαμβανομένων των αγγείων και του νεφρικού σπειράματος όπου συσσωρεύονται στο μεσάγγειο, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τη ΣΒΜ και τα ποδοκύτταρα σε άτομα με ΔΝΝ [114]. Τα AGE τροποποιούν και διαταράσσουν τη λειτουργία τόσο ενδο- όσο και εξωκυττάριων πρωτεϊνών όπως πχ η λαμινίνη και το κολλαγόνο τύπου IV, ενώ αυξάνουν και τη διαπερατότητα της ΣΒΜ. Επιπλέον, οι αυξημένες συγκεντρώσεις AGE αυξάνουν με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την έκφραση ινωδονεκτίνης και κολλαγόνου τύπων I και IV, με αποτέλεσμα αυξημένη πυκνότητα και επέκταση του εξωκυτταρικού στρώματος. Επίσης τα AGE μπορούν να συνδεθούν σε προφλεγμονώδεις υποδοχείς οι οποίοι στη συνέχεια ενεργοποιούν την παραγωγή .κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη (IL)-1, IL- 6, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor: TNF -α) και αυξητικών παραγόντων όπως ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β1 (transforming growth factor-β1: TGF-β1), ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας, η υπομονάδα Β του παραγόμενου από τα αιμοπετάλια αυξητικού παράγοντα (platelet-derived growth factor subunit B: PDGF - B), ο αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού (connective tissue growth factor: CTGF). Τα ποδοκύτταρα αποτελούν ένα ευαίσθητο στόχο των AGE καθώς εκφράζουν τον υποδοχέα για τα AGE (RAGE) [115]. Από δεδομένα μελετών με καλλιέργειες ποδοκυττάρων, φαίνεται ότι η γλυκοζυλιωμένη λευκωματίνη μέσω σύνδεσης της στον RAGE μειώνει την έκφραση της νεφρίνης, γεγονός που είναι σε συμφωνία με τα χαμηλά επίπεδα νεφρίνης που έχουν παρατηρηθεί στη ΔΝΝ [42]. Η χορήγηση αναστολέων του μονοπατιού των AGE, φαίνεται να επιβραδύνει την

εξέλιξη της ΔΝΝ [116, 117] και φαίνεται ότι αυτό εν μέρει το επιτυγχάνουν μειώνοντας την απόπτωση των ποδοκυττάρων [118].

5.2.2 Αυξητικοί παράγοντες

Αυξητικοί παράγοντες όπως ο TGF - β1, ο VEGF και ο CTGF επάγονται μέσα και από άλλα μονοπάτια όπως των εξοζαμινών και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης. Ο TGF - β1 οδηγεί στην υπερτροφία των κυττάρων και την αύξηση μεσαγγειακού στρώματος.

Σημαντικό ρόλο όπως προαναφέρθηκε παίζει ο VEGF που παράγεται από τα ποδοκύτταρα καθώς φαίνεται να συμμετέχει στην αυξημένη διαπερατότητα των σπειραματικών τριχοειδών στα μακρομορία που ενδεχομένως κρύβεται πίσω από την παθογένεση της διαβητικής λευκωματινουρίας. Σύμφωνα με δεδομένα από πειραματικά μοντέλα ΣΔ, ο VEGF έχει θετική ρύθμιση στο διαβητικό νεφρό και φαίνεται να αναπαράγει ορισμένες πτυχές της διαβητικής σπειραματοπάθειας, ενώ ο ανταγωνισμός του VEGF εξασθενεί τη λευκωματινουρία και άλλα συναφή χαρακτηριστικά της ποδοκυτταροοπάθειας.

5.3 Φλεγμονή - κυτταροκίνες

Εκτός από τα παραπάνω, η ΔΝΝ είναι συνέπεια μια χρόνιας ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος και μια χαμηλού βαθμού φλεγμονής στους ασθενείς με ΣΔ.

Μια σειρά από δείκτες φλεγμονής όπως η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein - CRP), IL-1 , IL-6 και IL-18, και ο TNFα είναι αυξημένοι στη ΔΝΝ και τα επίπεδά τους συσχετίζονται με λευκωματινουρία και εξέλιξη σε νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Ωστόσο, φλεγμονώδεις παράγοντες φαίνονται να εμπλέκονται και

στην ανάπτυξη της σωληναροδιάμεσης βλάβης. Σύμφωνα με πειραματικά μοντέλα ΔΝΝ, η φλεγμονή οδηγεί στη συσσώρευση μακροφάγων στο διάμεσο χώρο μεταξύ των σωληναρίων τα οποία παράγουν ελεύθερες ρίζες, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και πρωτεάσες που επάγουν τη σωληναριακή βλάβη. Επιπλέον, τα σπειραματικά και άλλα νεφρικά κύτταρα παράγουν μια σειρά φλεγμονωδών παραγόντων όταν εκτίθενται σε συνθήκες υπερδιήθησης καί λευκωματινουρίας [119]. Σε κυτταρικό επίπεδο, αυτές οι κυτταροκίνες φαίνεται να αυξάνουν τη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων συμβάλλουν στην υπερκυτταρικότητα του σπειράματος και την πάχυνση της ΣΒΜ, ενώ επάγουν την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και μπορεί να είναι άμεσα τοξικές στα νεφρικά κύτταρα [120].

Ο NF-κB (nuclear factor- κB) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση πολλαπλών γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, την ανοσία, την απόπτωση και χημειοελκτική πρωτεΐνη-1, μεταξύ άλλων και εντοπίζεται στα σπειραματικά, διάμεσα, σωληναριακά και επιθηλιακά κύτταρα στο νεφρό. Στη ΔΝΝ η ενεργοποίηση του συσχετίζεται με πρωτεϊνουρία και διήθηση των διάμεσων κυττάρων. Η πρωτεϊνουρία είναι γνωστό ότι διεγείρει περαιτέρω τον NF -κB και συμβάλλει στην επίμονη πρωτεϊνουρία με ένα κυκλικό τρόπο [121, 122].

5.4 Σύστημα ρενίνης - αγγειοτενσίνης - αλδοστερόνης (ΣΡΑΑ)

Το ΣΡΑΑ είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία και εξέλιξη της ΔΝΝ. Φαρμακευτικές παρεμβάσεις με τους αΜΕΑ και αναστολείς υποδοχέων αγγειοτενσίνης να επιβραδύνουν την εξέλιξη της νόσου [123-126]. Αρχικά θεωρείτο ότι αυτή τους η δράση μεσολαβείται από τη μείωση της ΑΠ και πιο συγκεκριμένα της ενδοσπειραματικής πίεσης που είναι αυξημένη σε συνθήκες υπερδιήθησης όπως στη ΔΝΝ. Πραγματικά, τα ποδοκύτταρα είναι ευάλωτα στη μηχανική τάση που

ασκείται από την αυξημένη ενδοσπειραματική πίεση με αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ή την απόπτωση [127-130]. Ωστόσο, υπάρχουν στοιχειά που υποδεικνύουν και μια περισσότερο εντοπισμένη δράση του ΣΡΑΑ σε επίπεδο ποδοκυττάρου που φαίνεται να επάγει την απόπτωση και την έκφραση του TGF-b mRNA [127].

Κάτω από συνθήκες που αναπαράγουν ένα διαβητικό περιβάλλον (π.χ. υπεργλυκαιμία, μηχανική τάση) επάγεται η έκφραση ορισμένων συστατικών του ΣΡΑΑ στα ποδοκύτταρα όπως το αγγειοτενσινογόνο, η προρενίνη και υποδοχείς της αγγειοτενσίνης (ΑΤ1) [127, 131]. Επιπλέον, τα επίπεδα αγγειοτενσίνης Ι και ΙΙ φαίνεται να ενισχύονται από τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης. Επίσης, σύμφωνα με δεδομένα από πειραματικά μοντέλα ΔΝΝ, η αναστολή του μονοπατιού της λιποοξυγενάσης-12 μειώνει την έκφραση των ΑΤ1, την πρωτεϊνουρία και τη σπειραματική υπερτροφία υποδεικνύοντας την τοπική δράση ΣΡΑΑ σε επίπεδο ποδοκυτταρου που σχετίζεται με τη σπειραματική βλάβη [132]. Σε συμφωνία με τα παραπάνω είναι δεδομένα που δείχνουν ότι η συνδυασμένη χορήγηση λοσαρτάνης με αλισκιρένη (ενός εκλεκτικού αναστολέα της ρενίνης) μειώνει τη λευκωματουρία σε ασθενείς με ΣΔ 2 ανεξάρτητα από την αντιϋπερτασική τους δράση [133].

Δεδομένα από ανοσοϊστοχημικές μελέτες εντοπίζουν την παρουσία του ΜΕΑ2 (ACE2) στα ποδοκύτταρα και μεσαγγειακά κύτταρα. Το ΜΕΑ2 είναι ομολογο του ΜΕΑ και καταλύει τη μετατροπή της αγγιεοτενσίνης ΙΙ σε αγγειοτενσινη -1 -7 [134]. Με αυτό τον τρόπο, περιορίζει τις ενίοτε επιβλαβείς δράσεις της αγγειοτενσίνης ΙΙ. Είναι ενδιαφέρον, ότι τα επίπεδα του ΜΕΑ2 στο σπείραμα φαίνεται να μειώνονται σε ασθενείς [135, 136] και ζωικά μοντέλα [137-139] με ΔΝΝ, γεγονός που πιθανά οδηγεί σε αυξημένη σηματοδότηση μέσω ΑΤ1. Μάλιστα η χορήγηση αναστολέα του ΜΕΑ2 ή η απουσία του γονιδίου σε ζωικά μοντέλα ΣΔ, οδηγεί σε επιδείνωση της

λευκωματινουρίας [140-142] η οποία μπορεί να επιτρέψει την ενισχυμένη σηματοδότηση σε ποδοκύτταρα μέσω AT1.

5.5 Ενεργές ρίζες οξυγόνου

Η υπεργλυκαιμία και ενεργοποίηση του ΣΡΑΑ επάγουν το οξειδωτικό στρες στο νεφρό, όπως και σε άλλα όργανα και ιστούς, το όποιο ορίζεται ως βλάβη των μακρομορίων που προκαλούνται από ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species; ROS). Η NADPH οξειδάση (NOx) είναι μια πλούσια πηγή της παραγωγής ROS στο νεφρό και μάλιστα εντός του ποδοκυττάρου. Η αναστολή της NADPH οξειδάσης με αποκυνίνη σε ζωικά μοντέλα ΣΔ μειώνει τη λευκωματινουρία, υποδηλώνοντας ένα ρόλο για τις ROS στη σπειραματική βλάβη. Υπάρχουν 7 ισομορφές της NADPH οξειδάσης. Η NOx 4, η οποία εντοπίζεται στα νεφρικά αγγεία, τα μεσαγγειακά κύτταρα, τα σωληναριακά κύτταρα και τα ποδοκύτταρα, φαίνεται να είναι η κύρια πηγή των ROS στο νεφρό και μπορεί, συνεπώς, διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην οξειδωτικό στρες που σχετίζεται με τις διάφορες νεφροπάθειες. Μάλιστα, η μείωση της έκφρασης της NOx4 με antisense ολιγονουκλεοτίδια σε πειραματικα μοντέλα ΣΔ, φαίνεται να μειώνει την παραγωγή ROS και τη λευκωματινουρία.

5.6 Κυκλοοξυγενάση και προστανοειδή

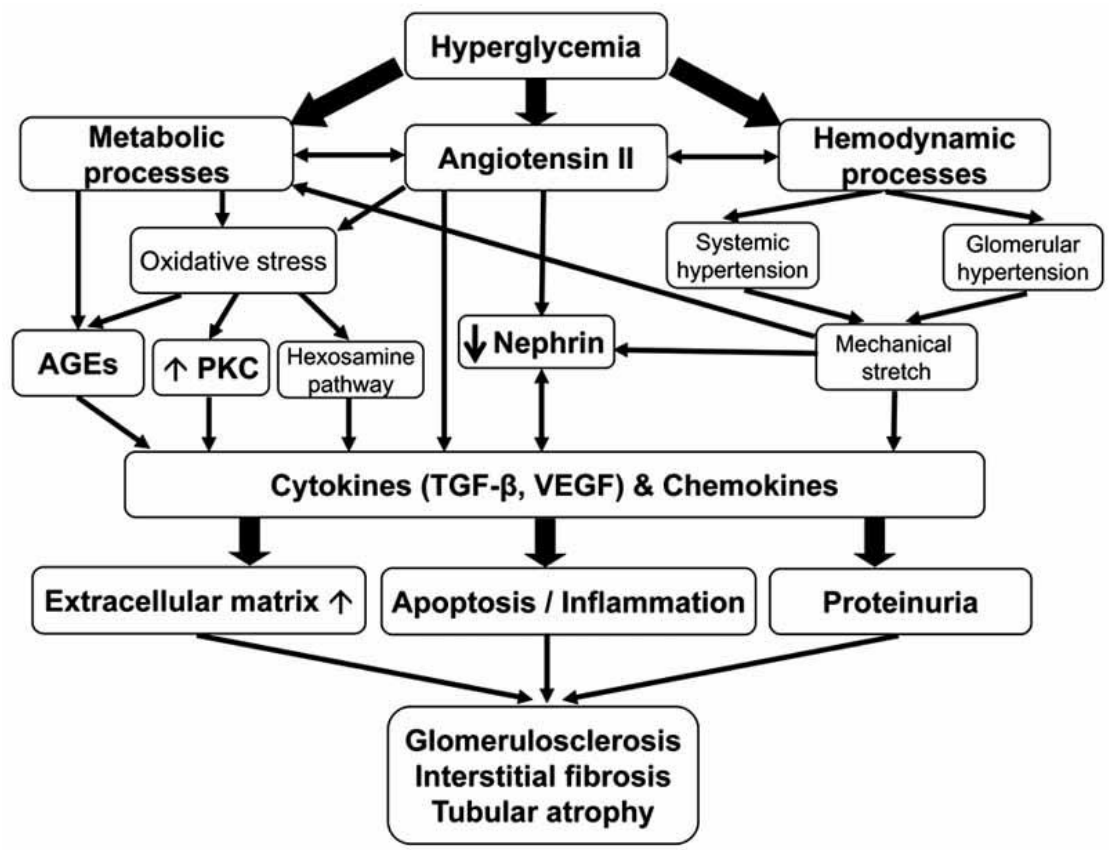
Ο ρόλος των προστανοειδών και την αναστολείς της σύνθεσης τους μέσω των αναστολέων της κυκλοξυγενάσης (COX) στη φυσιολογία του νεφρού είναι διφορούμενος. Αφενός είναι γνωστό ότι οι αναστολείς της COX μπορεί να προκαλέσουν νεφρική βλάβη μειώνοντας την αιματική ροή προς τους νεφρούς και επακόλουθα, το ΡΣΔ. Ωστόσο, είναι γνωστό από χρόνια ότι οι αναστολείς COX

μπορούν να μειώσουν την πρωτεϊνουρία σε μια σειρά σπειραματοπαθειών [143-145] όπως και στη ΔΝΝ [146]. Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός. Από πειραματικά μοντέλα όσο και ιστολογικά δεδομένα από ανθρώπους φαίνεται να αυξάνεται η έκφραση COX-2 στα ποδοκύτταρα πρώιμα στη ΔΝΝ [147-149]. Μάλιστα τα ποδοκύτταρα εκφράζουν μια σειρά από υποδοχείς προστανοειδών κάποιοι από τους οποίους σχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξη της πρωτεϊνουρίας [148, 149]. Πιθανά λοιπόν τα προστανοειδή να ασκούν άμεσες δράσεις στα ποδοκύτταρα.

5.7 Άλλοι παράγοντες

Άλλοι παράγοντες όπως οι υποδοχείς PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) [150] και τα χαμηλά επίπεδα αντιπονεκτίνης [151] φαίνεται να σχετίζονται αιτιολογικά με την ποδοκυτταρική βλάβη στη ΔΝΝ, χωρίς ωστόσο να είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένος ο μηχανισμός. Όσον αφορά στους PPARγ, αγωνιστές τους όπως η ροσιγλιταζόνη και η πιογλιταζόνη φαίνεται να έχουν τοπική δράση στα ποδοκύτταρα. Η ροσιγλιταζόνη αυξάνει τη παρουσία των GLUT 1 υποδοχέων και την πρόσληψη γλυκόζης από τα ποδοκύτταρα, ενώ η πιογλιταζόνη ρυθμίζει την έκφραση νεφρίνης. Η αντιπονεκτίνη έχει σχετιστεί με τη σύντηξη των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων και τη λευκωματινουρία. Σύμφωνα με στοιχεία από ζωικά μοντέλα, η παντελής έλλειψη αντιπονεκτίνης έχει σχετιστεί με προδιάθεση στην ποδοκυτταρική βλαβη. Υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν ένα προστατευτικό ρόλο της αντιπονεκτίνης για τα ποδοκύτταρα μέσω ελέγχου του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης. Επίσης μένει να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των microRNA [152]. έως τώρα έχουν αναγνωριστεί 5 ειδικά για το νεφρό, εκ

των οποίων το miRNA-192 φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα TGF-β1 και κολλαγόνου 1α2.



Από Ziyadeh, F.N. and Wolf G. [153]

Σχήμα 1: Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της ΔΝΝ.

Οι μεταβολικές και αιμοδυναμικές διεργασίες βρίσκονται σε στενή συνάφεια και επάγονται από την υπεργλυκαιμία. Η αγγειοτενσίνη ΙΙ πάιζει καθοριστικό ρόλο ως μεσολαβητής της λευκωματινουρίας και επάγοντας μια σειρά κυττοκινών. Επιπρόσθετα, η αγγειοτενσίνη ΙΙ μεσολαβεί τη σπειραματική υπερδιήθηση και αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα ενεργοποιώντας τους μεταφορείς γλυκόζης. Η έκκριση της επάγεται στο νεφρό μέσα από μία σειρά μεταβολικών και αιμοδυναμικών μηχανισμών. Το οξειδωτικό στρες, που εν μέρει προάγεται από την αγγειοτενσίνη ΙΙ, είναι σημαντικό για το σχηματισμό των προϊόντων τελικής γλυκοζυλίωσης. Η πρωτεϊνουρία με τη σειρά της επάγει τη έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων που οδηγούν σε διάμεση ίνωση και σωληναριακή ατροφία.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ο ρόλος της λευκωματινουρίας και η ανάγκη για πρωιμότερους δείκτες διάγνωσης

Όπως προαναφέρθηκε, η λευκωματινουρία έχει κλασικά χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση και την ταξινόμηση της βαρύτητας της ΔΝΝ. Για την ακρίβεια, έχει αποτελέσει κατά παράδοση την πρώτη κλινική εκδήλωση της ΔΝΝ και έχει μάλιστα θεωρηθεί ότι προηγείται της έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας.

Η παρουσία πρωτεΐνης (και συγκεκριμένα της λευκωματίνης με ΜΒ 67 kDa) στα ούρα σημαίνει εξ ορισμού την κατάρρευση του ηθμού διήθησης. Μάλιστα, τα επίπεδα της λευκωματινουρίας σχετίζονται με τον κίνδυνο εξέλιξης σε ΧΝΝ [17]. Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, η λευκωματινουρία αποτελεί ουσιαστικά μια συνεχή μεταβλητή [13] και ακόμα και τιμές λευκωματινουρίας στα ανώτερα από τα κλασικά θεωρούμενα ως φυσιολογικά (<30 mg/day) σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΧΝΝ αλλά και ΚΑΝ [14-16]. Θεωρείται μάλιστα ότι πρωτεϊνουρία δεν είναι απλά ένας δείκτης της σπειραματικής βλάβης, ούτε απλώς ένας προγνωστικός δείκτης της εξέλιξης της ΧΝΝ και ΚΑΝ, αλλά έχει αιτιολογικό ρόλο στην παθογένεια [17]. Τα υψηλά επίπεδα λευκωματίνης κατακλύζουν τη μεταβολική ικανότητα των νεφρικών σωληναρίων, επάγοντας έτσι την φλεγμονή οδηγώντας σε σωληναροδιάμεση ίνωση και επακόλουθη μείωση του ΡΣΔ. Η δυνατότητα παρέμβασης πριν από τα γεγονότα αυτά είναι ζωτικής σημασίας, καθώς μετά την ουλοποίηση στο σωληναροοδιάμεσο ιστό και σπειραμα η βλάβη είναι μη αναστρέψιμη. Η επακόλουθη ενεργοποίηση του ΣΡΑΑ έχει γνωστές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα και ως εκ τούτου συμβάλλει στην αύξηση του κινδύνου ΚΑΝ.

Φαρμακευτικές παρεμβάσεις με αναστολείς του ΣΡΑΑ που μειώνουν την λευκωματινουρία [30, 154, 155] φαίνεται να επιβραδύνουν την εξέλιξη της ΧΝΝ [156], αν και υπάρχουν δεδομένα που θέτουν το παραπάνω υπό αμφισβήτηση [157].

Όσον αφορά στη χρήση της λευκωματινουρίας ως διαγνωστικός δείκτης της ΔΝΝ, υπάρχουν και άλλοι περιορισμοί.

Πρώτον, τα επίπεδα της ημερήσιας απέκκρισης λευκωματίνης από τα ούρα επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως η υψηλή διαιτητική πρόσληψη σε πρωτεΐνες και λίπος, η εντατική άσκηση, η αντίσταση στην ινσουλίνη, η ΑΠ, οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος κ.α . Επιπλέον, η λευκωματινουρία δεν είναι ένας ειδικός δείκτης για τη διάγνωση της ΔΝΝ, αλλά αποτελεί ένα γενικότερο δείκτη νεφρικής και συγκεκριμένα σπειραματικής βλάβης με αποτέλεσμα την παρουσία της σε μια σειρά άλλων παθήσεων εκτός του ΣΔ.

Τέλος, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που δείχνουν ότι η απουσία της λευκωματινουρίας στο ΣΔ δεν αποκλείει την παρουσία νεφρικής βλάβης. Έχουν παρατηρηθεί προοδευτική μείωση της νεφρικής λειτουργίας και ιστολογικές αλλοιώσεις σε ασθενείς με ΣΔ και νορμολευκωματινουρία [10, 158]. Έχει αναφερθεί ότι περίπου το 20-30% των ασθενών με ΣΔ τύπου 2 και έκπτωση νεφρικής λειτουργίας εμφανίζουν νορμολευκωματινουρία. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν έλλειψη συσχέτισης μεταξύ αυξημένων επιπέδων λευκωματίνης ούρων και χαμηλού ΡΣΔ. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί έκπτωση νεφρικής λειτουργίας σε διαβητικούς ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα λευκωματίνης ούρων [18, 159]. Συγκεκριμένα, το 10% των ασθενών με ΣΔ τύπου 1 και νορμολευκωματινουρία παρουσίασαν μείωση του ΡΣΔ. Σε μία άλλη μελέτη οι ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένη ΔΝΝ και νορμολευκωματινουρία. δε διέφεραν σημαντικά από

εκείνους με λευκωματινουρία όσο αφορούσε την πρόοδο της νεφρικής δυσλειτουργίας, την έναρξη αιμοκάθαρσης και καρδιαγγειακά επεισόδια [158].

Επιπλέον, παρά την εξέλιξη στον τομέα της φαρμακολογίας και τη συνεχή ανάπτυξη νέων αντιδιαβητικών παραγόντων, ο επιπολασμός των ασθενών με τελικού σταδίου νεφρική νόσο τελικού σταδίου σε έδαφος ΔΝΝ εξακολουθεί να αυξάνεται ανά τον κόσμο. Έως τώρα τουλάχιστον, δεν υπάρχουν θεραπευτικές μέθοδοι που να μπορούν αν οδηγήσουν στην υποχώρηση της νεφρικής βλάβης μετά την ανάπτυξη της. Ωστόσο, η λευκωματινουρία έχει σοβαρούς περιορισμούς ως διαγνωστικός δείκτης της ΔΝΝ σε πρώιμο στάδιο όπου τυχόν θεραπευτικές παρεμβάσεις θα μπορούσαν να αναστρέψουν μέρος της νεφρικής βλάβης. Ως εκ τούτου, η έγκαιρη διάγνωση και την επακόλουθη έναρξη αναστολέων του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη ή αναστολή της εξέλιξης σε νεφρική νόσο τελικού σταδίου .

Από όλα τα παραπάνω, προκύπτει η σημασία ανάδειξης νέων δεικτών στον προσδιορισμό της ΔΝΝ.

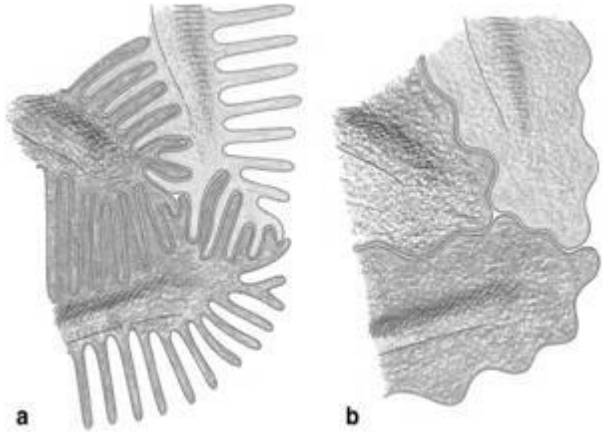
2. Ποδοκυτταρική βλάβη στις σπειραματοπάθειες

Η ποδοκυτταρική βλάβη έχει αναγνωριστεί πλέον ως ο βασικός μοριακός μηχανισμός στην παθοφυσιολογία των περισσότερων πρωτεϊνουρικών παθήσεων [109]. Η αρχική δυσλειτουργία των ποδοκυττάρων αποτελεί σημείο-κλειδί για την έναρξη της νόσου, ενώ ο επακόλουθος κυτταρικός θάνατος καθοδηγεί την εξέλιξη αυτής [111].

Ξέρουμε πια, ότι η απόκριση του ποδοκυττάρου προς τα βλαπτικά ερεθίσματα είναι παρόμοια ανεξάρτητα από τον αρχικό αιτιολογικό παράγοντα της ποδοκυττάρικής βλάβης (γενετικός, περιβάλλοντικός, ή και τα δύο) [111]. Συγκεκριμένα, η προσβολή

του ποδοκυττάρου οδηγεί στην συνολική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και συνεπώς στην αποπλάτυνση και ακολούθως εξάλειψη των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα το πλάτος τους αυξάνεται έως και 60%, ενώ το μήκος μειώνεται έως 70 % σε σύγκριση με το φυσιολογικό. το τελικό αποτέλεσμα αυτών των δομικών μεταβολών είναι να διαταράσσεται η εκλεκτική ως προς το μέγεθος διήθηση από το σπείραμα οδηγώντας στην εμφάνιση πρωτεϊνουρίας.

Σχήμα 2: Οι ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις



Εξάλειψη των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων: a) φυσιολογικό; b) αποπλάτυνση

Παράλληλα, ο αριθμός των ποδοκυττάρων μειώνεται ως αποτέλεσμα της απόπτωσης ή αποκόλλησης από τη ΣΒΜ. Περιοχές της ΣΒΜ μένουν γυμνές και αποτελούν εστίες ανάπτυξης συμφύσεων με τα τοιχωματικά επιθηλιακά κύτταρα και την ανάπτυξη μηνοειδών σχηματισμών με αποτέλεσμα την ανάπτυξη τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης και, αργότερα, τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια [111]. Σύμφωνα με τα έως τώρα δεδομένα, θεωρείται ότι η εξάλειψη των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων όχι μόνο είναι αναστρέψιμη στα πρώιμα στάδια [110], αλλά είναι και ζωτικής σημασίας για την επιβίωση υγιών ποδοκυττάρων στο σπείραμα [111].

3. Το ποδοκύτταρο στη διαβητική νεφρική νόσο

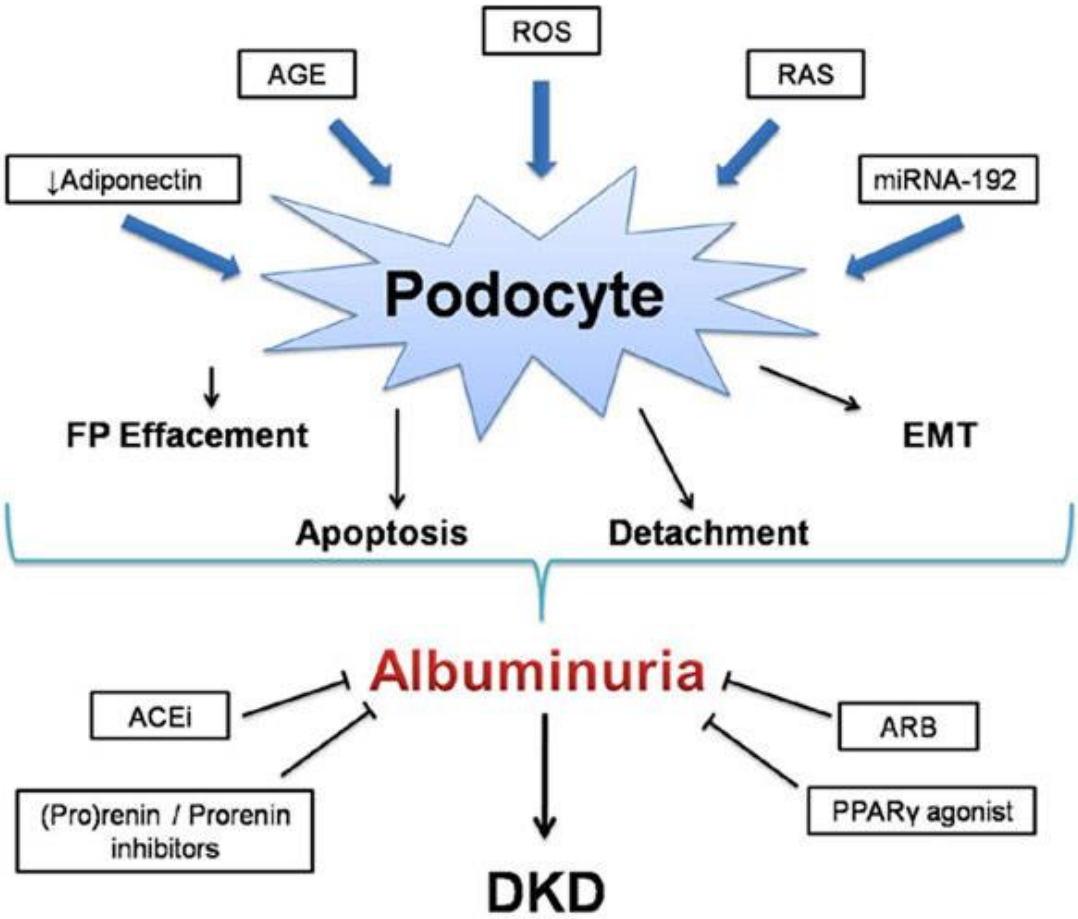
Στοιχεία προσβολής των ποδοκυττάρων έχουν αναφερθεί σε βιοψίες ασθενών με ΣΔ τύπου 1 και 2. Ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 εμφάνιζαν μειωμένο αριθμό ποδοκυττάρων ανεξάρτητα από την ηλικία (10 – 69 ετών) ή τη διάρκεια του ΣΔ [160]. Μείωση του αριθμού των ποδοκυττάρων και αύξηση του εύρους των ποδοειδών εκβλαστήσεων έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2, τόσο Ινδιάνους Pima [24] όσο και Καυκάσιας φυλής [161, 162]. Μάλιστα, ο χαμηλός αριθμός των ποδοκυττάρων ανά σπείραμα έχει αναδειχθεί ως ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας για ταχύτερη εξέλιξη της νεφρικής νόσου [163]. Σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2, η απέκκριση λευκωματίνης έχει συσχετιστεί αρνητικά με την πυκνότητα των ποδοκυττάρων και του ΛΔ ανά σπείραμα και θετικά με το εύρος των ποδοειδών εκβλαστήσεων [161].

Η ποδοκυτταρική βλάβη όπως αυτή εμφανίζεται στη ΔΝΝ με την εξάλειψη των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων, την υπερτροφία, την αποκόλληση και την επιθήλιο-μεσεγχυματικη μετάβαση (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT) συσχετίζεται αιτιολογικά με την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας [164, 165], ενώ ο μειωμένος αριθμός ποδοκυττάρων στο σπείραμα αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη για την ανάπτυξη νεφροπάθειας σε ασθενείς με ΣΔ [163]. Η αποκόλληση των ποδοκυττάρων από τη ΣΒΜ αποτελεί πρώιμο εύρημα στη ΔΝΝ [161]. Όπως και στις άλλες σπειραματοπάθειες, η απογύμνωση της ΣΒΜ από τα ποδοκύτταρα πυροδοτεί το παθοφυσιολογικό μηχανισμό που θα οδηγήσει προοδευτικά στη σπειραματοσκλήρυνση.

Σε πειραματικά μοντέλα ΔΝΝ, στα πρώιμα στάδια τα ποδοκύτταρα χάνουν την έκφραση νεφρίνης, οι εκβλαστήσεις απαλείφονται και αποκολλώνται από τη ΣΒΜ ή αποπίπτουν , γεγονότα που σχετίζονται με την εμφάνιση της λευκωματινουρίας [160, 166, 167].

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός ποδοκυτταρικής βλάβης είναι η ΕΜΤ. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα επιθηλιακά κύτταρα υφίστανται μορφολογικές αλλαγές, με αποτέλεσμα την απώλεια των επαφών κυττάρου-κυττάρου, μεταβολή στην κυτταρική πολικότητα και αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης . Τα κύτταρα συχνά επανέρχονται σε ένα ανώριμο αδιαφοροποίητο φαινότυπο που θυμίζει ένα πρωιμότερο αναπτυξιακό στάδιο. Ο TGF-β αποτελεί ένα ισχυρό επαγωγέα ΕΜΤ, με θετική ρύθμιση στα σπειράματα και τμήματα νεφρώνων σε ένα αριθμό νεφροπαθειών, συμπεριλαμβανομένης της ΔΝΝ [168] . Επίσης φαίνεται ότι η δράση του TGF-β καταστέλλει την έκφραση των βασικών πρωτεϊνών του ΛΔ, επάγει την έκφραση πρωτεϊνών του εξωκυττάριου στρώματος (π.χ. φιμπρονεκτίνη και κολλαγόνο Ι) και οδηγεί στην έκκριση της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 του στρώματος (MMP- 9). Αυτές οι αλλαγές είναι σύμφωνες με την υπόθεση ότι η ΕΜΤ των ποδοκυττάρων συμβάλλει στη δημιουργία ενός ελαττωματικού πειραματικού ηθμού και την ανάπτυξη λευκωματινουρίας [169].

Η παθοφυσιολογία της ποδοκυτταρικής βλάβης περιγράφηκε αναλυτικά ως στην ενότητα "**Διαβητική νεφρική νόσος: παθοφυσιολογία".** Περιληπτικά να αναφέρουμε ότι παράγοντες όπως το αιμοδυναμικό στρες (το οποίο μεταδίδεται στα ποδοκύτταρα μέσω της αυξημένης ενδοσπειραματικής πίεσης), η δράση της αγγειοτασίνης ΙΙ, των προστανοειδών, των AGE, των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αυξητικών παραγόντων όπως ο TGF-β και ο VEGF αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές της ποδοκυτταρικής βλάβης.



[165]

Σχημα 3: Μεσολαβητές της ποδοκυτταρικής βλάβης στη ΔΝΝ.

Αρκετά μοριακά μονοπάτια φαίνεται να συμμετέχουν στην αναπτυξη της ποδοκυτταρικής βλάβης στη ΔΝΝ. Κάποια από αυτά είναι α) τα χαμηλά επίπεδα αντιπονεκτίνης, η παραγωγή προϊόντων τελικλης γλυκοζυλίωσης, ενεργές ρίζες οξυγόνου, ενεργοποίηση του ΣΡΑΑ, miRNA κα. Η προσβολή των ποδοκυττάρων εκδηλώνεται με την αποπλάτυνση των ποδοκυτταρικών εκβλαστήσεων, την απόπτωση, την αποκόλληση από τη ΣΒΜ, και την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση. Παράγοντες όπως οι αναστολείς του ΣΡΑΑ και οι αγωνιστές των PPARγ υποδοχέων φαίνεται να αναστέλλουν αυτη τη διαδικασία.

4. Δείκτες ποδοκυτταρικής βλάβης στα ούρα

Εκτός από τα ιστολογικά ευρήματα, στοιχεία ενδεικτικά ποδοκυτταρικής βλάβης έχουν προκύψει και από τα ούρα ασθενών με ΣΔ. Αρχικά, η παρουσία ποδοκυττάρων στα ούρα (ποδοκυττουρία) αναφέρθηκε σε ζωικά μοντέλα και ασθενείς με άλλες σπειραματοπάθειες όπως ΝΕΑ, μεμβρανώδη νεφροπάθεια,

μεμβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα, IgA νεφροπάθεια και νεφρίτιδα του λύκου [170-174]. Σε 20 ασθενείς με IgA νεφροπάθεια και Henoch Schonlein πορφύρα μελετήθηκε η ιστολογική εξέλιξη της νόσου καθώς και η παρουσία ποδοκυττάρων στα ούρα με τη χρήση ανοσοφθορισμού σε διάστημα 1 χρόνου. Με μετρήσεις στα ούρα ανά 2 εβδομάδες επί 1 χρόνο και βιοψίες στο σημείο 0 και στο 12ο μήνα. Φάνηκε ότι η απέκκριση των ποδοκυττάρων συσχετίζονταν ποσοτικά με την ιστολογική εξέλιξη τόσο με οξείες αλλαγές όσο και με τις χρονιότερες αλλοιώσεις και το βαθμό σπειραματοσκληρυνσης [175].

Με τη χρήση ανοσοφθορισμου και ως μόριο στόχο την ποδοκαλυξινη αναδείχθηκε ποδοκυττουρία σε ένα πληθυσμο από ασθενείς με ποικίλες σπειραματονεφρίτιδες (μεσαγγειοϋπερπλαστική, μεμβρανώδης, IgA νεφροπάθεια, ΝΕΑ, νεφρίτιδα λύκου, Henoch-Schonlein πορφύρα, σύνδρομο Alport). Η παρουσία ποδοκυττάρων στα ούρα αναδείχθηκε σε όλους τους ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα όχι όμως στους μάρτυρες ή σε εκείνους με μη σπειραματική πρωτεϊνουρία. Μάλιστα, ο βαθμός ποδοκυττουρίας φάνηκε να σχετίζεται με τη σοβαρότητα των ιστολογικών αλλοιώσεων όπως η υπερπλασία του μεσαγγείου, οι εξωτριχοειδικές αλλοιώσεις και η σωληναροδιάμεση βλάβη [172].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι φαίνεται πως τα ποδοκύτταρα που χάνονται στα ούρα αυτά είναι βιώσιμα. Σε ένα πειραματικό μοντέλο ΔΝΝ αρουραίων, μετά τη συλλογή και την απομόνωση των ποδοκυττάρων από τα ούρα, αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες υποδεικνύει ότι τα κύτταρα αυτά είναι βιώσιμα [176]. Επιπλέον, η ποδοκυττουρία φαίνεται να αποτελεί σημείο ενεργότητας της σπειραματικής νόσου [170]. Με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής και ως μόριο-στόχο την ποδοκαλυξίνη, εξετάστηκαν 38 ασθενείς με οξεία σπειραματονεφρίτιδα, 15 με χρόνια και 44 υγιείς

μάρτυρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα επίπεδα ποδοκυττουρίας ήταν σημαντικά υψηλότερα σε εκείνους με ενεργή νόσο.

Η ποδοκυττουρία έχει επιπλέον μελετηθεί ως διαγνωστικός δείκτης στην προ-εκλαμψία με ιδιαίτερη προγνωστική σημασία [177-179].

Η ανίχνευση ολόκληρων ποδοκυττάρων ή τμημάτων αυτών έχει αναφερθεί τόσο σε πειραματικά μοντέλα ΔΝΝ όσο και σε ανθρώπους. Σε ένα ζωικό μοντέλο ΔΝΝ ανιχνεύθηκαν ποδοκύτταρα στα ούρα αρουραίων Sprague-Dawley [180]. Τα κύτταρα αυτά κατόπιν αναπτύχθηκαν για σύντομο χρονικό διάστημα σε καλλιέργειες, γεγονός που υποδεικνύει ότι είναι βιώσιμα κατά την αποκόλληση τους από τη ΣΒΜ.

Η παρουσία ολόκληρων ποδοκυττάρων έχει αναφερθεί και σε ασθενείς με ΣΔ και διάφορα επίπεδα λευκωματινουρίας [174, 181-185]. Ακόμα και σε άτομα με επίπεδα λευκωματίνης ούρων εντός του φυσιολογικού έχουν ανιχνευθεί ποδοκύτταρα με συχνότητα περίπου 50% σε αντίθεση με τις ομάδες ελέγχου αυτών των μελετών.

Ωστόσο, πέρα από τις μελέτες που αναδεικνύουν την παρουσία στα ούρα ποδοκυττάρων αυτών καθ' αυτών, υπάρχουν και στοιχεία που η προσβολή των ποδοκυττάρων σε ορισμένες νοσολογικές οντότητες υποδεικνύεται εμμέσως μέσα από την παρουσία στα ούρα μορίων όπως πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων, ειδικών για τα ποδοκύτταρα .

Η ανίχνευση ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα μελετήθηκε σε πειραματικό μοντέλο, στο οποίο προκλήθηκε ποδοκυτταρική βλάβη μέσω ένεσης τοξίνης της διφθερίτιδας σε διαγονιδιακούς αραουραίους με έκφραση του αντίστοιχου υποδοχέα στα ποδοκύτταρα [186]. Στα ούρα των αρουραίων ανιχνεύθηκε mRNA νεφρίνης και ποδοσίνης και συσχετίστηκε χρονικά με την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας. Η παρουσία ποδοκυτταρικού mRNA (και συγκεκριμένα νεφρίνης, ποδοσίνης) έχει αναφερθεί και

σε ασθενείς με διάφορες νεφροπάθειες που χαρακτηρίζονται από πρωτεϊνουρία όπως ΝΕΑ, IgA νεφροπάθεια, μεμβρανώδη νεφροπάθεια [187]. Μάλιστα σε ασθενείς με νεφρίτιδα του λύκου, φαίνεται ότι τα επίπεδα mRNA νεφρίνης, ποδοσίνης και συναπτοποδίνης στα ούρα σχετίζονταν με την ενεργότητα της νόσου [188]. Οι μελέτες έως τώρα περιλαμβάνουν μικρούς και ανομοιογενείς πληθυσμούς ασθενών καθιστώντας επισφαλή την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων.

5. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσουμε κατά πόσον η παρουσία ΣΔ σχετίζεται με την εμφάνιση ποδοκυτταρικών μορίων στα ούρα ασθενών χωρίς γνωστή ΔΝΝ.

6. Πληθυσμός και Μέθοδοι

6.1 Πληθυσμός της μελέτης

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείτο από 80 ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και απουσία γνωστής ΔΝΝ. Ο πληθυσμός της μελέτης στρατολογήθηκε σε διάστημα 6 μηνών (από τον Ιανουάριο έως και τον Ιούνιο του 2011) στο Μεταβολικό εξωτερικό ιατρείο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Κριτήρια αποκλεισμού αποτέλεσαν i) η παρουσία ΧΝΝ, ii) ιστορικό λευκωματινουρίας, iii) ενεργός λοίμωξη του ουροποιητικού, iv) λήψη νεφροτοξικών φαρμάκων και v) η πρόσφατη έναρξη ΣΔ (<1 έτος). Η υπέρταση, η ΚΑΝ και υπερλιπιδαιμία δεν απετέλεσαν κριτήρια αποκλεισμού.

Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από 50 μη διαβητικά άτομα. Για λόγους ομοιογένειας και με σκοπό την ασφαλή σύγκριση των δυο ομάδων, στην ομάδα

ελέγχου συμπεριλήφθηκαν άτομα με υπέρταση, ΚΑΝ και/ ή υπερλιπιδαιμία, όπως ακριβώς και στην ομάδα ασθενών. Σε αρκετές περιπτώσεις η στρατολόγηση έγινε στο εξωτερικό ιατρείο Υπέρτασης και Λιπιδίων, ενώ σε άλλες περιπτώσεις επρόκειτο για τους/τις συζύγους των στρατολογημένων διαβητικών ασθενών διευκολύνοντας το ταίριασμα της ομάδας ελέγχου με τους ασθενείς. Κριτήρια αποκλεισμού αποτέλεσαν i) η παρουσία ΣΔ, ii) η παρουσία ΧΝΝ, iii) ιστορικό λευκωματινουρίας, iv) ενεργός λοίμωξη του ουροποιητικού και v) λήψη νεφροτοξικών φαρμάκων.

Τέλος, μελετήθηκε και μία ομάδα 10 νεαρών (ηλικίας 20 έως 30 ετών) και υγιών ατόμων.

Έγινε καταγραφή βασικών δημογραφικών στοιχείων, ενώ πληροφορίες σχετικές με το ιστορικό και τη διάρκεια του ΣΔ, τις συννοσηρότητες, το κάπνισμα και την τρέχουσα φαρμακευτική αγωγή ελήφθησαν για όλους τους συμμετέχοντες.

Επίσης, στους ασθενείς πραγματοποιήθηκαν ανθρωπομετρικές μετρήσεις (ύψος, βάρος, περίμετρος μέσης και υπολογισμός δείκτη μάζας σώματος).

Μέσα από τα αρχικά ευρήματα μέτρησης των επιλεγμένων ποδοκυτταρικών δεικτών προέκυψε ότι το προφίλ έκφρασης αυτών των δεικτών στα ούρα ακολουθεί δύο βασικά μοτίβα: Α.) μόνο συναποτοποδίνη ή Β.) συναπτοποδίνη + νεφρίνη και/ή ποδοσίνη.

Έτσι, ο πληθυσμός της μελέτης (ασθενείς και ομάδα ελέγχου) χωρίστηκε ανάλογα με το προφίλ έκφρασης ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα στις εξής δύο ομάδες: άτομα με έκφραση νεφρίνης και/ή ποδοσίνης (επιπλέον της συναποτοποδίνης) και έκφραση μόνο συναπτοποδίνης, ανεξάρτητα από την παρουσία ΣΔ ή όχι, και ακολούθησε σύγκριση των δύο ομάδων. Σκοπός αυτής της επιπλέον σύγκρισης ήταν να

προσδιοριστεί το κατά πόσον, υπάρχουν άλλοι παράγοντες που να επηρεάζουν την παρουσία αυτών των δεικτών στα ούρα και να προκαθορίζουν την έκφραση.

Όλοι οι συμμετέχοντες, αφού ενημερώθηκαν για τους σκοπούς της μελέτης, έδωσαν γραπτή συγκατάθεση. Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή ηθικής και δεοντολογίας του νοσοκομείου μας, και διενεργήθηκε σύμφωνα με τους κανόνες που ορίζει η διακήρυξη του Ελσίνκι (1989).

6.2 Εργαστηριακές μετρήσεις

Τα δείγματα αίματος ελήφθησαν πρωινές ώρες μετά από νηστεία τουλάχιστον 8 ωρών και πραγματοποιήθηκε βιοχημικός έλεγχος με τις συνήθεις μεθόδους Ελήφθησαν τυχαία δείγματα ούρων (spot) για ον προσδιορισμό της λευκωματίνης, πρωτεΐνης και κρεατινίνης ούρων.

6.3 Συλλογή δειγμάτων ούρων, προετοιμασία και εξαγωγή ολικού RNA

Για τον προσδιορισμό των ποδοκυτταρικών δεικτών συλλέχθηκε ο πλήρης όγκος ούρων πρωινής ούρησης από όλους τους συμμετέχοντες. Εντός 1 ώρας, τα ούρα φυγοκεντρούταν στις 3500 rpm για 30 λεπτά και κατόπιν για 1300 rpm για 5 λεπτά στους 4˚ C. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, πραγματοποιούταν εξαγωγή ολικού RNA από το ίζημα κυττάρων με τη χρήση ειδικού κιτ (RNeasy MiniKit, Qiagen). Η ποσοτικοποίηση και ο έλεγχος της καθαρότητας του RNA έγινε με τη μέτρηση της σχετικής απορρόφησης στα 260/280 nm σε Nanodrop (Thermo-Scientific, Del., USA).

6.4 Αντίστροφη μεταγραφή

Για την αντίστροφη μεταγραφή αναμειγνύονταν 2 μl ολικού RNA με 1 μl of 10 m M dNTP mix, 100 ng τυχαίων εξαμερών (random hexamers) (Invitrogen TM , Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA) με αποστειρωμένο, αποσταγμένο νερό σε τελικό όγκο. Κατόπιν, το μίγμα θερμαινόταν στους 65 ° C για 5 λεπτά και επωαζόταν στον πάγο για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, προσθέτονταν 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος 5X first-strand, 1 μl διαλύματος DTT συγκέντρωσης 0.1 M, 1 μl RNaseOUT TM Recombinant RNase Inhibitor και 1 μl αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript TM III RT (Invitrogen TM , Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA) και το μίγμα επωαζόταν στους 25 ° C για 5 λεπτά, στους 50 ° C για 60 λεπτά και τελικά, στους 70 ° C για 15 λεπτά. Το συμπληρωματικό DNA φυλασσόταν στους –80 ° C έως τη χρήση του.

6.5 Ποσοτική, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Quantitative -PCR)

Για την ανίχνευση ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Real Time Quantitative -PCR. Επιλέχθηκαν 3 ειδικά για τα ποδοκύτταρα μόρια, η νεφρίνη, η ποδοσίνη και η συναπτοποδίνη, και έγινε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των mRNA αυτών στα ούρα μετά από την προαναφερθείσα προετοιμασία. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των ανάλογων αντιδραστηρίων (iTaq TM SYBR ® Green supermix with RO , Bio-Rad, Calif., USA) στη συσκευή ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο 2–ΔΔCt και όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν. Επίσης μετρήθηκαν και τα επίπεδα mRNA της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΰδης (GAPDH) σύμφωνα με τα

οποία ομαλοποιήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των 3 γονιδίων στόχων (housekeeping gene).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Νεφρίνη: forward 5 ′ -CAA CTG GGA GAG ACT GGG AGA A-3 ′, reverse 5 ′ -AAT CTG ACA ACA AGA CGG AGC A-3 ′, ποδοσίνη: forward 5 ′ -AAG AGT AAT TAT ATT CCG ACT GGG ACA T-3 ′, reverse 5 ′ -TGG TCA CGA TCT CAT GAA AAG G-3 ′ , συναπτοποδίνη: forward 5 ′ - CCC AAG GTG ACC CCG AAT-3 ′, reverse 5 ′ -CTG CCG CCG CTT CTC A-3 ′ και GAPDH: forward 5 ′ -TGG TCA CCA GGG CTG CTT T-3 ′, reverse 5 ′ -AGC TTC CCG TTC TCA GCC T-3 ′.

Η ποσοτικοποίηση του mRNA έγινε με τη μέθοδο της πρότυπης καμπύλης ή αλλιώς καμπύλης αναφοράς (standard curve). Για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε cDNA ανθρώπινου νεφρού (υγιές τμήμα νεφρού μετά από εκλεκτική νεφρεκτομή στα πλαίσια διερεύνησης νεφρικού όγκου) με γνωστή αρχική συγκέντρωση και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της καμπύλης αποδιάταξης (Melting curve ή Dissociation curve) για την αξιολόγηση των προϊόντων της αντίδρασης.

Τα επίπεδα mRNA που προέκυψαν για τους τρεις δείκτες κατόπιν ομαλοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα κρεατινίνης ούρων με σκοπό να διορθώσουμε ως προς την πυκνότητα των ούρων.

6.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση IBM SPSS 19.0. Οι ποιοτικές μεταβλητές εκφράζονται με την απόλυτη και συνεχή συχνότητα. Η δοκιμασία μονού δείγματος Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ύπαρξης ή όχι κανονικής κατανομής στα δεδομένα. Οι ποσοτικές

μεταβλητές που ακλουθούν κανονική κατανομή εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα του μέσου (mean ± SEM), ενώ εκείνες που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή εκφράζονται ως διάμεση τιμή (εύρος). Για τις ποσοτικές μεταβλητές έγινε έλεγχος με t-test για ανεξάρτητα δείγματα όταν η κατανομή ήταν κανονική και Mann-Whitney test για τις μη κανονικές κατανομές. Για τις ποιοτικές μεταβλητές πραγματοποιήθηκε έλεγχος x^2 ή ακριβής έλεγχος του Fisher. Η σχέση μεταξύ των μεταβλητών ελέγχθηκε με τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης του Pearson.Για την εκτίμηση των ανεξάρτητων προβλεπτικών παραγόντων της παρουσίας mRNA νεφρίνης ή ποδοσίνης στα ούρα χρησιμοποιήθηκε δυαδική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης (binary logistic regression analysis). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο p value <0.05.

7. Αποτελέσματα

7.1 Πληθυσμός και χαρακτηριστικά

Αρχικά, στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 80 ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και 50 μη διαβητικοί μάρτυρες. Εννέα διαβητικοί ασθενείς και 11 μάρτυρες φάνηκε να έχουν αυξημένα επίπεδα λευκωματινουρίας (ACR > 20 mg/g) και δε συμπεριλήφθηκαν στην τελική ανάλυση. Επίσης μελετήθηκαν 10 νέα και υγιή άτομα ηλικίας 20 έως 30 ετών αποκλειστικά ως προς την απέκκριση ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα.

Μετά τις προαναφερθείσες τροποποιήσεις στην τελική αναλυση και σύγκριση δεδομένων συμπεριλήφθησαν 71 ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και αντίστοιχα 39 μη διαβητικούς μάρτυρες με φυσιολογική απέκκριση λευκωματίνης ούρων. Τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα για τις δύο ομάδες φαίνονται στον πίνακα 1(α και β). Οι ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 διέφεραν σημαντικά από την

ομάδα ελέγχου όσον αφορούσε την παρουσία υπερχοληστερολαιμίας ($p < 0.001$), υπερτριγλυκεριδαιμίας ($p = 0.003$), κεντρικής παχυσαρκίας ($p = 0.002$) και υπέρτασης ($p = 0.003$) με τους διαβητικούς ασθενείς να εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα των εν λόγω χαρακτηριστικών σε σχέση με τους μη διαβητικούς. Με άλλα λόγια, οι δύο ομάδες διέφεραν σημαντικά ως προς παράγοντες που σχετίζονται εγγενώς και παθοφυσιολογικά με την παρουσία του ΣΔ. Ως εκ τούτου διέφεραν σημαντικά και ως προς σχετική φαρμακευτική αγωγή (στατίνες, αντιϋπερτασικα). Επίσης, οι δύο ομάδες διέφεραν σημαντικά ως προς τις καπνιστικές συνήθειες ($p = 0.04$), με τους διαβητικούς να είναι λιγότερα συχνά ενεργοί καπνιστές και περισσότερο συχνά πρώην καπνιστές από ότι τους μη διαβητικούς μάρτυρες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δύο ομάδες δε διέφεραν σημαντικά ως προς τα επίπεδα εκτιμώμενου ΡΣΔ καθώς και λευκωματινουρίας.

Πίνακας 1α: Χαρακτηριστικά ατόμων με ΣΔ και μη διαβητικών μαρτύρων

	Διαβητικοί n=71	**Μάρτυρες n=39**	**Σύνολο n=110**	**p**
Άρρεν φύλο	27 (38 %)	11 (28.2%)	38 (34.5%)	0.300
Ενεργοί καπνιστές	9 (12.5%)	11 (28.2%)	20 (18.2%)	*0.030*
Υπέρταση	44 (62.0%)	15 (38.5%)	59 (53.7%)	*0.018*
Υπερχοληστερολαιμία	52 (76.5%)	16 (41%)	68 (61.8%)	*0.001*
Υπερτριγλυκεριδαιμία	40 (56.3%)	9 (23%)	49 (44.5)	*0.001*
Κεντρική παχυσαρκία	57 (80.3%)	20 (51.3%)	77 (70%)	*0.001*
ΣΝ	9 (12.7%)	3 (7.7%)	12 (10.9%)	0.423
Περιφερική αρτηριακή νόσος	0	1 (2.6%)	1 (0.9%)	0.176
Αμφιβληστροειδοπάθεια	6 (8.5%)	0	6 (5.5%)	0.062
mRNA νεφρίνης/ποδοσίνης στα ούρα	38 (53.5%)	12 (30.8%)	50 (45.6%)	*0.022*
Καρωτιδική/ Εγκεφαλοαγγειακή νόσος	2 (2.8%)	1 (2.5%)	3 (2.7%)	0.398
Φάρμακα				
αΜΕΑ	17 (23.9%)	1 (2.6%)	18 (16.4%)	*0.004*
Αναστολείς υποδοχέων αγγειοτενσίνης	27 (38%)	6 (15.4%)	33 (30%)	*0.013*
Διουρητικά	17 (23.9%)	4 (10.2%)	21 (19.1%)	0.081
Αναστολείς διαύλων ασβεστίου	12 (16.8%)	0	12 (10.9%)	*0.007*
Στατίνες	46 (64.8%)	0	46 (41.8%)	*<0.001*

ΣΝ: Στεφανιαία νόσος, αΜΕΑ: αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου

Πίνακας 1β: Χαρακτηριστικά ατόμων με ΣΔ και μη διαβητικών μαρτύρων

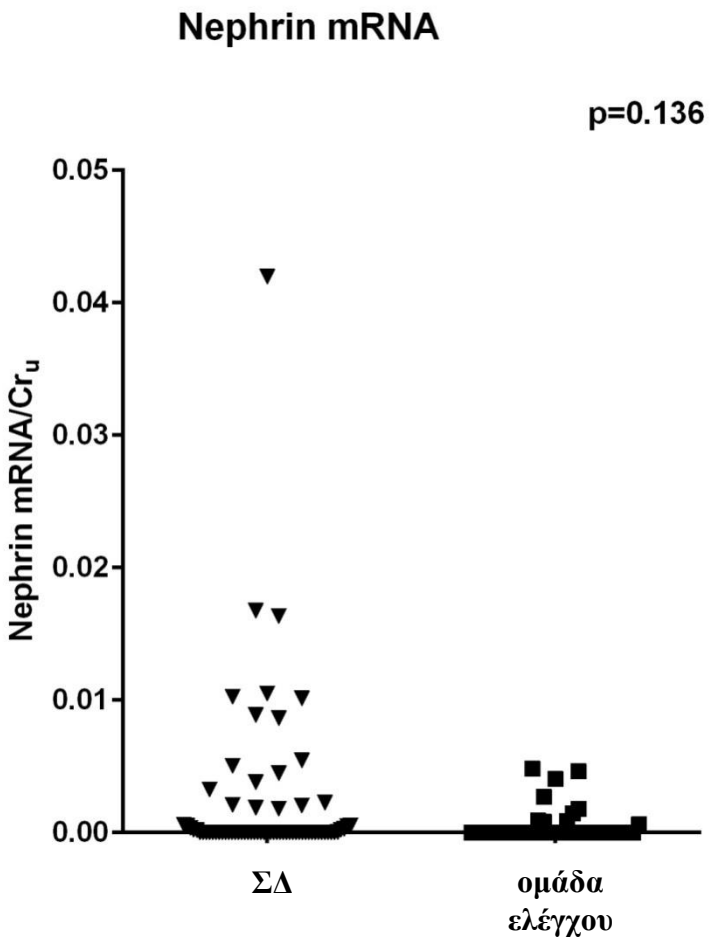
	Διαβητικοί n=71	**Μάρτυρες n=39**	**Σύνολο n=110**	**p**
Ηλικία (έτη)	64.6 (1.1)	62.3 (1.7)	63.8 (0.943)	0.147
Περίμετρος μέσης (cm)	102.9 (1.47)	95.6 (1.91)	100.3 (1.21)	*0.005*
ΣΑΠ (mmHg)	125.4(1.76)	125.2 (2.6)	125.3(1.46)	0.957
ΔΑΠ (mmHg)	73.4 (1.1)	73.3 (1.47)	73.7 (0.77)	0.992
Διάρκεια υπέρτασης (έτη)	6.6 (1.01)	5.9 (1.25)	6.5 (0.83)	0.527
Γλυκόζη (mg/dl)*	149.7 (5)	94 (2.01)	133.3 (4.61)	*<0.001*
Κρεατινίνη (mg/dl)	0.9 (0.020)	1.1 (0.21)	0.97 (0.075)	0.112
Ουρία (mg/dl)	37.7 (1.19)	39.2 (1.63)	38.2 (0.96)	0.458
Εκτιμώμενος ΡΣΔ	78.5 (1.74)	75.4 (2.13)	77.5 (1.39)	0.286
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	166.7 (3.91)	195.8 (7.78)	174.4 (3.78)	*0.008*
LDL- χοληστερόλη (mg/dl)	92.9 (2.94)	114.7 (5.54)	98.6 (2.78)	*0.006*
HDL- χοληστερόλη (mg/dl)	44.1 (1.42)	50.3 (6.5)	45.7 (1.31)	*0.037*
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	157.9 (10.7)	149.4 (20.7)	155.7(9.49)	0.844
Λευκωματίνη/ Κρεατινίνη ούρων (mg/g)	8.3 (0.63)	9.9 (1.0)	8.86 (0.54)	0.147

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή (τυπικό σφάλμα του μέσου)
ΣΑΠ: Συστολική αρτηριακή πίεση, ΔΑΠ: Διαστολική αρτηριακή πίεση, ΡΣΔ: ρυθμός σπειραματικής διήθησης

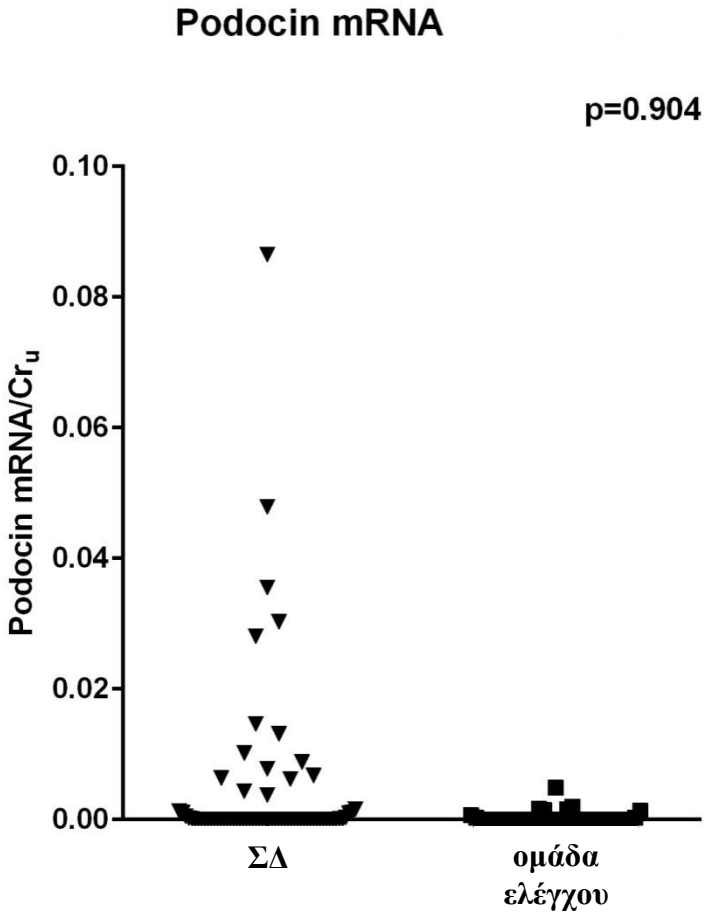
7.2 Μετρήσεις στα ούρα

Από τις μετρήσεις με real-time PCR προέκυψε ότι κανένας από τους 10 νέους υγιείς μάρτυρες δεν παρουσίαζαν mRNA ποδοκυτταρικών μορίων στα ούρα τους. Αντίθετα, mRNA συναπτοποδίνης ανιχνεύθηκε στα ούρα όλων των διαβητικών ατόμων όσο και της αντίστοιχης ομάδας ελέγχου μη διαβητικών μαρτύρων. Ωστόσο, δε συνέβη το ίδιο και με τη νεφρίνη και την ποδοσίνη. mRNA νεφρίνης ανιχνεύθηκε σε 43 από τους 71 διαβητικούς ασθενείς και σε 10 από τους 39 μάρτυρες, ενώ ποδοσίνης σε 44 ασθενείς με ΣΔ και 9 μάρτυρες. Τα επίπεδα mRNA νεφρίνης ήταν υψηλότερα στα άτομα με ΣΔ από ότι στην ομάδα ελέγχου ($p = 0.035$). Το ίδιο φάνηκε να ισχύει και για την ποδοσίνη όμως η σχέση ήταν μόνο οριακά σημαντική ($p = 0.058$). Τα επίπεδα mRNA συναπτοποδίνης δε διέφεραν μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Όταν τα επίπεδα διορθώθηκαν με τα επίπεδα κρεατινίνης ούρων οι σχέσεις έγιναν μη σημαντικές. Παρακάτω παρατίθενται σχηματικές απεικονίσεις των επιπέδων των τριών ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα των ασθενών σε σύγκριση με τους μη διαβητικούς μάρτυρες. Η ανίχνευση mRNA νεφρίνης και / ή ποδοσίνης στα ούρα φάνηκε να είναι συχνότερη στην ομάδα των διαβητικών παρά στην ομάδα ελέγχου (53.5 vs. 30.8%, αντίστοιχα, $p = 0.022$).

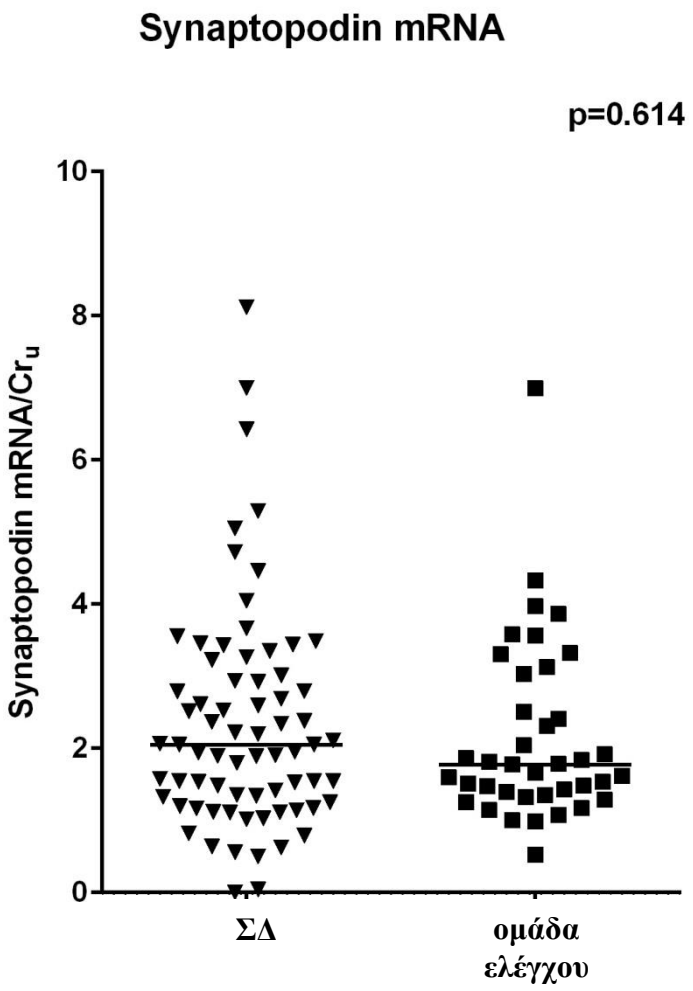
Σχήμα 1: Τα επίπεδα mRNA νεφρίνης σε ασθενείς με ΣΔ και μη διαβητικούς μάρτυρες



Σχήμα 2: Τα επίπεδα mRNA ποδοσίνης σε ασθενείς με ΣΔ και μη διαβητικούς μάρτυρες



Σχήμα 3: Τα επίπεδα mRNA συναπτοποδίνης σε ασθενείς με ΣΔ και μη διαβητικούς μάρτυρες



7.3 Σύγκριση ομάδων ανάλογα με το προφίλ έκφρασης ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα

Κατόπιν, και όπως περιγράφηκε στις μεθόδους, καθοδηγούμενοι από τα παραπάνω ευρήματα χωρίσαμε τον πληθυσμό της μελέτης σε 2 ομάδες ανάλογα με το ποδοκυτταρικό τους προφίλ στα ούρα σε εκείνους που εκφράζουν μόνο συναπτοποδίνη (n = 60) και σε εκείνους που εκφράζουν νεφρίνη και / ή ποδοσίνη επιπλέον της συναποτοποδίνης (n = 50), ανεξάρτητα από την παρουσία ΣΔ ή όχι. Για λόγους ευκολίας θα χρησιμοποιούνται στο εξής οι περιφραστικοί όροι "νεφρίνη και/ή ποδοσίνη" και "μόνο συναπτοποδίνη". Τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτών των 2 ομάδων φαίνονται στον πίνακα 2 (α και β). Οι δύο ομάδες διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους μόνο ως προς την παρουσία τους ΣΔ με το ΣΔ να είναι σημαντικά συχνότερος στην ομάδα "νεφρίνη και/ή ποδοσίνη" (76%) σε σχέση με την ομάδα "μόνο συναπτοποδίνη" (55%, p = 0.022).

Πίνακας 2α: Σύγκριση μεταξύ ατόμων με έκφραση νεφρίνης / ποδοσίνης και ατόμων με έκφραση μόνο συναπτοποδίνης

	Ομάδα με έκφραση νεφρίνης/ ποδοσίνης n=50	**Ομάδα με έκφραση μόνο συναπτ/νης n=60**	**Σύνολο n=110**	**p**
Άρρεν φύλο	15 (30%)	23 (38.3%)	38 (34.5%)	0.360
Ενεργοί καπνιστές	10 (20%)	10 (16.7%)	20 (18.2%)	0.800
ΣΔ	38 (76%)	33 (55%)	71(64.5%)	*0.022*
Υπέρταση	30 (60%)	29 (48.3%)	59 (53.6%)	0.222
Υπερχοληστερολαιμία	33 (66%)	35 (58.3%)	68 (61.8%)	0.274
Υπερτριγλυκεριδαιμία	23 (46 %)	26 (43.3%)	49 (44.5)	0.779
Κεντρική παχυσαρκία	37(74.0%)	40 (66.7%)	77 (70%)	0.403
ΣΝ	5 (10%)	7 (11.7%)	12 (10.8%)	0.780
Περιφερική αρτηριακή νόσος	0	1 (1.7%)	1(0.9%)	0.359
Αμφιβληστροειδοπάθεια	5 (10%)	1 (1.7%)	6 (5.5%)	0.555
Καρωτιδική/ Εγκεφαλοαγγειακή νόσος	2 (4%)	1 (1.7%)	3 (2.7%)	0. 293
Φάρμακα				
αΜΕΑ	8 (16%)	10 (16.7%)	18 (16.4%)	0.925
Αναστολείς υποδοχέων αγγειοτενσίνης	20 (40. %)	13 (21.7%)	33 (10%)	*0.037*
Διουρητικά	12 (24 %)	9 (15%)	21 (19.1%)	0.232
Αναστολείς διαύλων ασβεστίου	25 (50%)	21(35%)	46 (41.8%)	0.112

ΣΝ: Στεφανιαία νόσος, αΜΕΑ: αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου

Πίνακας 2β: Σύγκριση μεταξύ ατόμων με έκφραση νεφρίνης / ποδοσίνης και ατόμων με έκφραση μόνο συναπτοποδίνης

	Ομάδα με έκφραση νεφρίνης/ ποδοσίνης n=50	**Ομάδα με έκφραση μόνο συναποτοποδίνης n=60**	**Σύνολο n=110**	**p**
Ηλικία (έτη)	65.1 (1.29)	62.6 (1.22)	63.7 (0.94)	0.184
Περίμετρος μέσης (cm)	98.9 (1.38)	101.5 (1.68)	100.3 (1.21)	0.281
ΣΑΠ (mmHg)	126.8 (2.53)	124 (1.66)	125.3(1.47)	0.374
ΔΑΠ (mmHg)	73.4 (1.52)	73.3 (0.94)	73.4 0.85)	0.943
Διάρκεια υπέρτασης (έτη)	6.4 (1.07)	6.5 (1.30)	6.5 (0.83)	0.946
Γλυκόζη (mg/dl)*	130.9 (5.14)	135.4 (7.7)	133.3 (4.61)	0.611
Κρεατινίνη (mg/dl)	0.88 (0.024)	0.92 (0.020)	0.90 (0.023)	0.247
Ουρία (mg/dl)	36.9 (1.55)	39.3 (1.19)	38 (0.91)	0.206
Εκτιμώμενος ΡΣΔ	77.6 (1.92)	77.3 (2.01)	77.5 (1.39)	0.920
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	169.4 (5.56)	179.3 (5.07)	174.4 (3.78)	0.190
LDL-χοληστερόλη (mg/dl)	96.7 (4.27)	100.5 (3.62)	98.2 (2.7)	0.488
HDL-χοληστερόλη (mg/dl)	46.4 (1.73)	45.2 (1.97)	45.7 (1.31)	0.652
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	135.5 (10.31)	175.3 (15.4)	155.7(9.49)	0.036
Λευκωματίνη/ Κρεατινίνη ούρων (mg/g)	9.5 (0.77)	8.09 (0.74)	8.9 (0.54)	0.198

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή (τυπικό σφάλμα του μέσου)
ΣΑΠ: Συστολική αρτηριακή πίεση, ΔΑΠ: Διαστολική αρτηριακή πίεση, ΡΣΔ: ρυθμός σπειραματικής διήθησης

7.4 Ανάλυση συσχέτισης

Τα επίπεδα mRNA νεφρίνης παρουσίασαν μια ισχυρή συσχέτιση με αυτά της ποδοσίνης ($r = 0.796$, $p < 0.001$). Παρατηρήθηκε μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων mRNA συναπτοποδίνης και ποδοσίνης ($r = –0.470$, $p = 0.05$), ενώ με τη νεφρίνη η σχέση φάνηκε να είναι επίσης αρνητική χωρίς όμως να είνα στατιστικά σημαντική. Τα επίπεδα mRNA συναπτοποδίνης παρουσίασαν μία σχετική συσχέτιση με το ΡΣΔ ($r = +0.194$, $p = 0.043$). Τα επίπεδα λευκωματινουρίας όπως αυτά εκφράζονται μέσα από τον λόγο λευκωματίνης προς κρεατινίνη ούρων (ACR) παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με τη διάρκεια της υπέρτασης ($r = +0.266$, $p = 0.026$) καθώς και με τα επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης ($r = +0.310$, $p = 0.011$), όχι όμως με τα επίπεδα mRNA νεφρίνης, ποδοσίνης και συναπτοποδίνης. Επίσης, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων κρεατινίνης και ουρίας και της διάρκειας του ΣΔ ($r = +0.315$, $p = 0.008$ και $r = +0.235$, $p = 0.05$, αντίστοιχα). Τα επίπεδα ουρίας σχετίζονταν θετικά με την ηλικία, ενώ ο ΡΣΔ εμφάνιζε αντίστροφη συσχέτιση με τη διάρκεια τόσο του ΣΔ όσο και της υπέρτασης ($r = –0.222$, $p = 0.058$ και $r = –0.393$, $p = 0.001$, αντίστοιχα).

7.5 Δυαδική λογιστική ανάλυση παλινδρόμησης

Η παρουσία του ΣΔ πρόεκυψε ως ο μόνος σημαντικός προβλεπτικός παράγοντας της παρουσίας νεφρίνης και/ή ποδοσίνης στα ούρα. Για την ακρίβεια οι διαβητικοί ασθενείς φάνηκε να παρουσιάζουν 2.6 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να παρουσιάζουν mRNA νεφρίνης και / ή ποδοσίνης στα ούρα τους σε σχέση με τους μη διαβητικούς μάρτυρες (Odds ratio 2.59, 95% CI 1.14–5.91, $p = 0.037$), ανεξάρτητα από την ηλικία, το φύλο, το ΡΣΔ, τη λευκωματινουρία, την παρουσία

υπερχοληστερολαιμίας, υπερτριγλυκεριδαιμίας, υπέρτασης και κεντρικης παχυσαρκίας.

8. Συζήτηση

Η προσβολή των ποδοκυττάρων διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην ανάπτυξη των σπειραματοπαθειών [189, 190]. Η ΔΝΝ χαρακτηρίζεται από σημαντικές μεταβολές στη δομή και τη λειτουργία των στα ποδοκυττάρων με αρνητική ρύθμιση πρωτεϊνών ειδικών για τη λειτουργία τους καθώς και μειωμένος αριθμός ποδοκυττάρων (ποδοκυττοπενία) [42, 51, 125, 163, 189, 191, 192]. Η ανίχνευση ποδοκυττάρων ή σχετικών δεικτών στα ούρα έχει αναφερθεί πιθανός δείκτης ποδοκυτταρικής βλάβης σε μια σειρά σπειραματοπαθειών συμπεριλαμβανομένης και της ΔΝΝ καθώς και της προεκλαμψίας και άλλων νόσων [107, 174, 179, 193-197].

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την απέκκριση στα ούρα mRNA 3 ειδικών για τα ποδοκύτταρα μορίων, της νεφρίνης, της ποδοσίνης και της συναπτοποδίνης σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και φυσιολογική απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα. Από όσο γνωρίζουμε πρόκειται για τον μεγαλύτερο πληθυσμό ατόμων με ΣΔ και νορμολευκωματινουρία που έχει μελετηθεί έως τώρα όσον αφορά την παρουσία ειδικών ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα.

8.1 Η παρουσία mRNA συναπτοποδίνης

Ίσως από τα πιο αξιοσημείωτα ευρήματα της παρούσας έρευνας ήταν η ανίχνευση mRNA συναπτοποδίνης τόσο στους 71 διαβητικούς ασθενείς όσο και στους 39 μη διαβητικούς μάρτυρες. Όπως αναφέρθηκε εκτενώς στο γενικό μέρος του παρόντος συγγράμματος, η συναπτοποδίνη είναι μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού σε άμεση σύνδεση με την ακτίνη που εκφράζεται κατ' εξοχήν στις εκβλαστήσεις των

ποδοκυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό καθώς και τις υψηλές ενδοσπειραματικές υδροστατικές πιέσεις στις οποίες εκτίθεται ο κυτταροσκελετός του ποδοκυτταρου, η παρουσία mRNA συναπτοποδίνης στα ούρα μπορεί πιθανά να ερμηνευθεί παθοφυσιολογικά.

Αν και πολλαπλές πρωτεΐνες συνδέονται με την ακτίνη, η συναποτοποδίνη είναι από τα πιο σημαντικά μόρια του κυτταροσκελετού και εκείνο που βρίσκεται σε πιο στενή επαφή με αυτόν σε σχέση με τα άλλα μόρια που εξετάσαμε στην παρούσα μελέτη (νεφρίνη, ποδοσίνη). Επίσης, στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα mRNA συναπτοποδίνης, εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με αυτά της νεφρίνης και ποδοσίνη, ενώ συσχετίζονταν θετικά με το ΡΣΔ. Λαμβάνοντας όλα τα παραπάνω υπόψη, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η απέκκριση συναπτοποδίνης στα ούρα μπορεί να είναι απόρροια της φυσιολογικής λειτουργίας του ποδοκυττάρου και διακίνησης κυτταρικού υλικού. Αν μη τι άλλο, ωστόσο, αυτό το εύρημα ωστόσο καθιστά τη συναπτοποδίνη ως μη ειδικό και επομένως ακατάλληλο δείκτη για τη διάγνωση της ποδοκυτταρικής βλάβης. Η παραπάνω υπόθεση μας υποστηρίζεται περαιτέρω και από τα ευρήματα άλλων μελετών. Οι Wang et al. μελέτησαν τα επίπεδα έκφρασης mRNA των ίδιων δεικτών (νεφρίνης, ποδοσίνης και συναποτοποδίνης) σε δείγματα νεφρικού ιστού από βιοψίες ατόμων (n=21) με ιστολογικά τεκμηριωμένη ΔΝΝ καθώς και στα ούρα των ίδιων ατόμων και τη συσχέτιση αυτών με τον αριθμό των ποδοκυττάρων στο σπείραμα [198]. Ως αναμενόμενο, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων mRNA και των τριών παραπάνω ποδοκυτταρικών δεικτών στο σπείραμα. Όσον αφορούσε όμως τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA στα ούρα ο αριθμός των μετρούμενων ποδοκυττάρων στο σπείραμα παρουσίαζε συσχέτιση και μάλιστα θετική με τα επίπεδα mRNA συναπτοποδίνης στα ούρα ($r=0.595$, $p=0.019$) αλλά με κανένα άλλο ποδοκυτταρικό μόριο. Άρα η απέκκριση

mRNA συναπτοποδίνης πιθανότερα να αποτελεί ένα φυσιολογικό αποτέλεσμα της παρουσίας και λειτουργίας των ποδοκυττάρων παρά δείκτη βλάβης τους. Ένα άλλο πρωτεϊνικό μόριο των ποδοκυττάρων, η ποδοκαλυξίνη, η οποία όπως αναφέρθηκε προηγουμένως εκφράζεται στην επιφάνεια των ποδοκυτταρων, έχει ανιχνευθεί στα ούρα και μάλιστα στην επιφάνεια κυστιδίων. Ενώ, αρχικά συσχετίστηκε με την ποδοκυτταρική βλάβη και φάνηκε να αντανακλά το βαθμό της αυτής [173], στη συνέχεια παρατηρήθηκε η παρουσία τους και σε υγιείς μάρτυρες [171].

8.2 Η ανίχνευση mRNA νεφρίνης και ποδοσίνης και η σχέση με την παρουσία ΣΔ

Όπως επισημάναμε προηγουμένως, μέσα από τα ευρήματα αυτής της μελέτης οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι αυτό στο οποίο ουσιαστικά διαφέρουν τα άτομα μεταξύ τους όσον αφορά το προφίλ έκφρασης των 3 δεικτών στα ούρα, είναι η παρουσία mRNA νεφρίνης ή ποδοσίνης. Για αυτό και ορίσαμε 2 νέες κατηγορίες και προχωρήσαμε στη σύγκριση αυτών. Ίσως το πιο αξιοσημείωτο εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν το γεγονός ότι οι διαβητικοί ασθενείς φάνηκε να διαφέρουν ως προς την απέκκριση στα ούρα mRNA νεφρίνης και ποδοσίνης από τους μη διαβητικούς μάρτυρες. Για την ακρίβεια, οι διαβητικοί ασθενείς παρουσίαζαν συχνότερα mRNA νεφρίνης και / ή ποδοσίνης στα ούρα από ότι τα άτομα χωρίς ΣΔ παρά το γεγονός ότι όλοι εμφάνιζαν φυσιολογική απέκκριση λευκωματίνης στα ούρα. Επιπλέον, από την ανάλυση παλινδρόμησης προέκυψε ότι η παρουσία ΣΔ αποτελεί το μόνο σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανίχνευση mRNA νεφρίνης και / ή ποδοσίνης ανεξάρτητα από όλους τους άλλους παράγοντες όπως η ηλικία, το κάπνισμα, η παρουσία υπέρτασης και λοιπές συννοσηρότητες. Μάλιστα, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ διαβητικών και ομάδας ελέγχου όσον αφορά την παρουσία

υπερχοληστερολαιμίας, υπερτριγλυκεριδαιμίας, κεντρικής παχυσαρκίας και υπέρτασης εξαφανίστηκαν στη σύγκριση των ομάδων "νεφρίνη και/ή ποδοσίνη" και "μόνο συναπτοποδίνη" γεγονός που περαιτέρω υποστηρίζει ότι η διαφορά στο προφίλ έκφρασης ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα των διαβητικών από τους μη διαβητικούς δεν μπορεί παρα να οφείλεται στον ίδιο το ΣΔ και όχι σε άλλους σχετιζόμενους με το ΣΔ παράγοντες. Επίσης, κανένας από τους κλασικούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου όπως η υπέρταση, η παχυσαρκία, το άρρεν φύλο, το κάπνισμα, οι δυσλιπιδαιμίες δεν σχετίζονταν θετικά με προφίλ έκφρασης νεφρίνης - ποδοσίνης στα ούρα. Ωστόσο, ο ακριβής παθοφυσιολογικός μηχανισμός που οδηγεί στην παρουσία mRNA νεφρίνης και ποδοσίνης στα ούρα διαβητικών ατόμων με φυσιολογική απέκκριση λευκωματίνης δεν έχει αποσαφηνιστεί. Μια υπόθεση είναι ότι θα μπορούσε να σχετίζεται με την υπερδιήθηση που ως γνωστόν χαρακτηρίζει τη ΔΝΝ στα πρωιμα στάδια. Για την ακρίβεια, το αιμοδυναμικό στρες που προκύπτει κάτω από συνθήκες υπερδιήθησης θα μπορούσε να συμβάλει στην απέκκριση ποδοκυτταρικού υλικού στα ούρα. Είναι επίσης πιθανό, μηχανισμοί που φερονται να μεσολαβούν την ποδοκυτταρική βλάβη στη ΔΝΝ, όπως οι διάφορες νευρο-ορμονικές μεταβολές και το οξειδωτικό στρες [153, 165] να καθιστούν τα ποδοκύτταρα πιο ευάλωτα στις παραπάνω συνθήκες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι για κανένα από τους 3 ποδοκυτταρικούς δείκτες που μελετήθηκαν δεν προέκυψε θετική συσχέτιση των επιπέδων mRNA με τα επίπεδα λευκωματίνης ούρων. Αυτό είναι σύμφωνο και με άλλες μελέτες [171, 174, 199, 200]. Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της ΔΝΝ που προτείνει ότι η ποδοκυτταρική βλάβη προηγείται και συμβάλλει στην ανάπτυξη της λευκωματινουρίας καθώς και με την υπόθεση μας, ότι δηλαδή η ανίχνευση των ποδοκυτταρικών δεικτών σα ούρα προηγείται της εμφάνισης της λευκωματινουρίας.

Ωστόσο, κάποιες άλλες μελέτες έχουν δείξει σημαντική θετική σχέση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα και του βαθμού πρωτεϊνουρίας. Ωστόσο, αυτά τα στοιχεία αφορούν ασθενείς με ΣΔ και γνωστή ΔΝΝ, στις περισσότερες περιπτώσεις επιβεβαιωμένη με βιοψία και τεκμηριωμένη μίκρο- ή μάκρολευκωματινουρία.

8.3 Απουσία ποδοκυτταρικών δεικτών σε νέα και υγιή άτομα

Ένα εξίσου σημαντικό εύρημα της μελέτης αποτελεί η απουσία ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα των 10 νέων και υγιών ατόμων που εξετάστηκαν. Αυτό έρχεται σε αντιδιαστολή με την παρουσία mRNA συναποτοποδίνης σε όλο τον υπόλοιπο πληθυσμό της μελέτης ανεξαιρέτως καθώς και νεφρίνης ποδοσίνης σε μεγάλο ποσοστό εξ αυτών, με το ΣΔ να αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου. Το εύρημα αυτό συνηγορεί υπέρ της υπόθεσης ότι ακόμα απουσία του ΣΔ ή άλλων νόσων ή βλαπτικών ερεθισμάτων, το σπείραμα και το ποδοκύτταρο υπόκεινται σε αλλαγές μέσα από τη διαδικασία της γήρανσης, ενώ φαίνεται το ποδοκύττταρο να έχει σημαντικό ρόλο [201]. Η σπειραματοσκλήρυνση σχετίζεται άμεσα με τη γήρανση και μάλιστα φαίνεται σε ιστοπαθολογικό εύρημα σε παραπάνω από 70% των ατόμων άνω των 40 ετών όπως προέκυψε από νεκροτομικές μελέτες [202]. Για την ακρίβεια φαίνεται να αυξάνεται η επίπτωση όπως και ο αριθμός των σκληρυσμένων σπειραμάτων με την ηλικία. Αντίστοιχα, γνωρίζουμε πως μειώνεται η νεφρική λειτουργία με την ηλικία με χαρακτηριστικές μεταβολές τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία [203]. Η ποδοκυτταρική βλάβη και η απώλεια του κυττάρου από το σπείραμα αποτελεί βασικό τμήμα στην όλη διαδικασία ανάπτυξης της σπειραματοσκλήρυνσης ανεξάρτητα από τον αιτιολογικό μηχανισμό [204]. Άλλωστε όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η παρουσία ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα

έχει δειχθεί σε περιπτώσεις σπειραματοσκλήρυνσης σχετιζόμενης με άλλες νοσολογικές οντότητες πχ. νεφρίτιδα του λύκου, IgA νεφροπάθεια [205]. Όσον αφορά τη σχετιζόμενη με τη γήρανση σπειραματοσκλήρυνση, φαίνεται ότι η αύξηση του μεσαγγείου και των ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί σε μία σχετική παρά απόλυτη "ανεπάρκεια" των ποδοκυττάρων να καλύψουν το σπείραμα με αποτέλεσμα την υπετροφία τους παρά στην υπερπλασία τους. Η υπερτροφία των ποδοκυττάρων οδηγεί με τη σειρά της σε μία σειρά μεταβολών σε επίπεδο κυτταρικής βιολογίας και κυρίως στην έκφραση μορίων-κλειδιών για τη δομή και τη λειτουργία τους όπως πχ η νεφρίνη [206, 207]. Είναι λοιπόν πιθανό οι παραπάνω μεταβολές να επιβαρύνουν περαιτέρω το γηρασμένο ποδοκύτταρο που δεν έχει τη δυνατότητα να αναγεννηθεί ειδικότερα στο περιβάλλον ενός εξίσου γηρασμένου νεφρού [208].

8.4 Η σημασία των ευρημάτων

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι δείκτες ποδοκυτταρικής βλάβης μπορούν να ανιχνευθούν στα ούρα ασθενών με ΣΔ και φυσιολογική απέκκριση λευκωματίνης ούρων. Η ΔΝΝ είναι γνωστόν ότι συνοδεύεται από σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα. Με την εξαίρεση των αναστολέων του ΡΑΑΣ που φαίνεται να έχουν κάποια σημαντική επίδραση όσον αφορά στη μείωση της λευκωματινουρίας, η πορεία εξέλιξης της ΔΝΝ δύσκολα μπορεί να αναχαιτιστεί. Το ποδοκύτταρο είναι κυτταρο τελικής διαφοροποίησης. Παρόμοια με το νευρικό κύτταρο, δεν αναγεννάται και δεν πολλαπλασιάζεται. Κατά το χρονικό σημείο που συμβαίνει η κλινική διάγνωση της ΔΝΝ, δηλ με την ανίχνευση αυξημένων επιπέδων λευκωματίνης ούρων, η ποδοκυτταρική βλάβη έχει ήδη επέλθει και έχει ενεργοποιηθεί ένας ολόκληρος καταρράκτης με πολλαπλά διασταυρούμενα μονοπάτια (οξειδωτικό στρες, φλεγμονή, αυξητικοί παράγοντες κτλ) που θα

οδηγήσουν τελικά στο ιστοπαθολογικό αποτέλεσμα της σπειραματοσκλήρυνσης. Αυτό είναι και το σημείο (της κλινικά εμφανούς λευκωματινουρίας) που θα γίνει η έναρξη αγωγής με αΜΕΑ ή αναστολέα υποδοχέων αγγειοτενσίνης (εφόσον το άτομο δεν είναι εκ των προτέρων σε κάποιον τέτοιο παράγοντα λόγω υπέρτασης) με σκοπό τη μείωση της λευκωματινουρίας. Η ανίχνευση των ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα σε άτομα με ΣΔ αλλά φυσιολογική λευκωματίνη ούρων υποδεικνύει εκείνο που είναι γνωστό αλλά δεν έχει εφαρμογή στην κλινική πράξη, ότι δηλ. η εξέλιξη στην ΔΝΝ με κλινικά ανιχνεύσιμη λευκωματινουρία ακολουθεί μια συντομότερη ή μακρύτερη - άγνωστο - υποκλινική πορεία σε άτομα με ΔΝΝ και φαινομενικά φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Είναι λοιπόν πιθανό ή τουλάχιστον χρήζει περαιτέρω διερεύνηση το κατά πόσον η ανακοπή αυτής της πορείας σε ένα πρωιμότερο στάδιο όπως πχ αυτό της νορμολευκωματινουρίας με θετικά ευρήματα ποδοκυτταρικών δεικτών από τα ούρα με κάποια θεραπευτική παρέμβαση όπως η αναστολή του ΡΑΣ θα μπορούσε να επιβραδύνει ή και να αναχαιτίσει την εμφάνιση κλινικά σημαντικής ΔΝΝ.

8.5 Προηγούμενες μελέτες

Ευρήματα ποδοκυτταρικής βλάβης σε ασθενείς με ΣΔ και φυσιολογική απέκκριση λευκωματίνης ούρων έχουν προκύψει και σε προηγούμενες μελέτες [174]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των do Nascimento et al. οι οποίοι συνέκριναν ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 και 2 με άτομα με προδιαβήτη κι μη διαβητικούς μάρτυρες ως προς την έκφραση αρκετών ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα (νεφρίνη, ποδοσίνη, ποδοκαλυξίνη, συναποτοποδίνη, TRPC1, TGF-β1, α-ακτινίνη-4) [209]. Τα άτομα με ΣΔ (χωρίς να παρατηρείται διαφορά μεταξύ των τύπου 1 ή 2) εμφάνιζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA για όλους τους δείκτες. Ωστόσο πρέπει να

σημειωθεί ότι το 50% των διαβητικών σε αυτή τη μελέτη είχαν μίκρο- ή μακρολευκωματινουρία, δηλ ΔΝΝ. Όταν μελετήθηκε ο ίδιος πληθυσμός ανάλογα με τα επίπεδα λευκωματίνης ούρων, οι διαβητικοί με νορμολευκωματινουρία εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα σε σχεση με τους μαρτυρες και άτομα με προδιαβήτη. Μια αδυναμία ωστόσο της μελέτης είναι ότι οι μάρτυρες ήταν σημαντικά νεότερος πληθυσμός από τα άτομα με προδιαβήτη και ΣΔ. Σε αυτή τη μελέτη τα επίπεδα mRNA νεφρίνης συγκεκριμένα συσχετίστηκαν με τα επίπεδα λευκωματινουρίας με μία αύξηση του κινδύνου λευκωματινουρίας κατά 20% ανά μονάδα αύξησης του log10 mRNA νεφρίνης.

Παρομοίως σε μια άλλη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 51 άτομα με ΣΔ τύπου 2 με ποικίλα επίπεδα λευκωματινουρίας καθώς και 13 υγιείς μάρτυρες και μελετήθηκε η έκφραση στα ούρα των εξής μορίων: συναπτοποδίνη, ποδοσίνη, ποδοκαλυξίνη, α-ακτινίνη 4, CD2-AP [210]. Τα επίπεδα mRNA όλων των παρακάτω μορίων ήταν αυξημένα στους διαβητικούς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όταν οι διαβητικοί χωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες ανάλογα με τα επίπεδα λευκωματινουρίας, φάνηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των 5 ποδοκυτταρικών δεικτών αυξάνονταν ανάλογα με τα επίπεδα λευκωματινουρία. Ωστόσο, η διαφορά μεταξύ νορμολευκωματινουρικών και μαρτύρων ήταν λιγότερο προφανής.

Μία άλλη μελέτη συμπεριέλαβε 21 ασθενείς με τεκμηριωμένη ιστοπαθολογικά ΔΝΝ και 9 υγιείς μάρτυρες [188]. Χρησιμοποιώντας και εδώ Real-time PCR, οι ερευνητές μέτρησαν τα επίπεδα έκφρασης νεφρίνης, ποδοσίνης, συναπτοποδίνης, WT-1 και α-ακτινίνης 4. Και σε αυτή τη μελέτη τα επίπεδα έκφρασης και των 5 δεικτών ήταν σημαντικά υψηλότερα στα άτομα με ΔΝΝ από ότι στους υγιείς μάρτυρες (p από 0.028 έως < 0.001). Η νεφρίνη και συναπτοποδίνη παρουσίασαν θετική συσχέτιση

με τα επίπεδα πρωτεϊνουρίας. Όμως και σε αυτήν την περίπτωση οι μάρτυρες αποτελούσαν έναν υγιή και σαφώς νεότερο πληθυσμό από τους ασθενείς.

Χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο και τους 3 ποδοκυτταρικούς δείκτες, νεφρίνη, ποδοσίνη, συναπτοποδίνη, μελετήθηκαν 71 ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και λευκωματινουρία [200]. Οι 3 δείκτες ανιχνεύθηκαν σε όλους τους ασθενείς και μάλιστα τα επίπεδα τους φάνηκε να σχετίζονται με τα επίπεδα ΡΣΔ όχι όμως με τη λευκωματινουρία και χωρίς ωστόσο να δοθεί μια ερμηνεία για αυτά τα αποτελέσματα από τους συγγραφείς .

Επιλέγοντας να ποσοτικοποιήσουν το πρωτεϊνικό μόριο της νεφρίνης, σε μία άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) και εξετάστηκαν 66 ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και διάφορα επίπεδα λευκωματινουρίας [199]. Σε όλα τα άτομα με μικρο- ή μάκρολευκωματινουρία ανιχνεύθηκε νεφρίνη στα ούρα τους, ενώ αντίστοιχα ευρήματα εμφάνισε το 54% των ατόμων με νορμολευκωματινουρία και κανένας από τους υγιείς μάρτυρες. Μάλιστα τα επίπεδα νεφρινουρίας γάνηκαν να σχετίζονται με τη λευκωματινουρία ($r = 0.89$, p,0.001) και αρνητικα με το ΡΣΔ ($r =-0.33$, $p = 0.005$)..

Με μια διαφορετική μέθοδο, αλλά παρόμοια λογική οι ομάδα των Hara et al. προσπάθησαν να ανιχνεύσουν την ποδοκυτταρική βλάβη στα ούρα ασθενών με διάφορες σπειραματοπάθειες (IgA νεφροπάθεια, ΝΕΑ, νεφρίτιδα του λύκου, μεμβρανοϋπερπλαστική σπιραματονεφρίτιδα, μεμβρανώδη νεφροπάθεια) και σε ασθενείς με ΣΔ με ή χωρίς πρωτεϊνουρία [211]. Σαν μόριο-στόχος χρησιμοποιήθηκε η ποδοκαλυξίνη και η ανίχνευση της έγινε με τις μεθόδους του ανοσοφθορισμού, της ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και του Western Blotting ενώ η τελική ποσοτικοποίηση της έγινε με τη μέθοδο της ELISA. Τα άτομα με κάθε είδους σπειραματοπάθεια παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα από τους υγιείς μάρτυρες. Το

ίδιο φάνηκε να ισχύει και για τα άτομα με ΣΔ. Όταν έγινε χωριστή ανάλυση ανάλογα με τα επίπεδα λευκωματινουρίας, φάνηκε ότι το 53.8% των ατόμων με ΣΔ και φυσιολογική απέκκριση λευκωματινης στα ούρα εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα ποδοκαλύξίνης με τα αντίστοιχα ποσοστά υψηλότερα για τούς διαβητικούς με μίκρο- ή μακρολευκωματινουρία (64.7 και 66.7%, αντίστοιχα). Αυτό το ποσοστό είναι εντυπωσιακά όμοιο με το ποσοστό των διαβητικών ασθενών της παρούσης μελέτης με έκφραση νεφρίνης ή ποδοσίνης στα ούρα.

8.6 Η ποδοκυττουρία και η επίδραση φαρμακευτικών ή άλλων παρεμβάσεων

Χρησιμοποιώντας τις ίδιες μεθόδους συν το γεγονός ότι προσδιορίστηκε τελικά ο ακριβής αριθμός των ακέραιων κυττάρων στο ίζημα, μία άλλη ομάδα ερευνητών προσπάθησε να προσδιορίσει την παρουσία ποδοκυττάρων στα ούρα ατόμων με ΣΔ καθώς και να εξετάσει κατά πόσο η χορήγηση ενός αΜΕΑ (τρανταλοπρίλης) μπορεί να επηρεάσει τον αριθμό των απεκκρινόμενων ποδοκυττάρων [174]. Μελετήθηκαν 50 άτομα με ΣΔ εκ των οποίων 10 εμφάνιζαν νορμολευκωματινουρία, 15 μικρολευκωματινουρία, 15 μακρολευκωματινουρία και 10 είχαν ΧΝΝ, καθώς και 10 υγιείς μάρτυρες. Ποδοκύτταρα στα ούρα ανιχνεύθηκαν στο 53% των ασθενών με μικρολευκωματινουρία (0.8-1.9 κύτταρα/ml) και στο 80% εκείνων με μακρολευκωματινουρία (0.8-5.3% κύτταρα/ml). Αντίθετα, δεν αναδείχθηκαν αντίστοιχα ευρήματα στους υγιείς μάρτυρες, σε ασθενείς με ΣΔ και νορμολευκωματινουρία και εκείνους με ΧΝΝ (απουσία ποδοκυττάρων στα ούρα). Δεν προέκυψε ποσοτική συσχέτιση μεταξύ αριθμού ποδοκυττάρων και ποσού λευκωματίνης στα ούρα, καθώς εντός της κάθε ομάδας (μικρολευκωματινουρία και μακρολευκωματινουρία) εκείνοι που δεν εμφάνισαν ποδοκυττουρία είχαν υψηλότερα επίπεδα λευκωματινουρίας σε σχέση με τους αντίστοιχους ασθενείς που

είχαν ποδοκύτταρα στα ούρα. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε ποσοτική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και αρτηριακής πίεσης με την ποδοκυττουρία. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο αριθμός των ποδοκυττάρων στα ούρα μειώθηκε σημαντικά ($p < 0.01$) μετά από 2 μήνες αγωγής με τρανταλοπρίλη και στις 2 ομάδες ασθενών. Πρέπει να σημειώσουμε ότι η τρανταλοπρίλη μείωσε σημαντικά την ΑΠ κατά περίπου 12 mmHg σε κάθε ομάδα ασθενών, αλλά δεν επηρέασε τα επίπεδα κρεατινίνης και γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης.

Η ίδια ομάδα ερευνητών θέλησε να εξετάσει μια ομάδα 30 ασθενών με ΣΔ και γνωστή μικρολευκωμαατινουρία ως prow την παρουσία ποδοκυττάρων στα ούρα και κατα πόσο η χορήγηση ενός αντιδιαβητικού φαρμάκου όπως η πιογλιταζόνη μπορεί να επηρεάσει την παρουσία τους [183]. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 ομάδες με τυχαιοποιούμενοι να λάβουν πιογλιταζόνη ή Placebo. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις κατά την έναρξη της μελέτης και κατόπιν στους 3 και 6 μήνες από την έναρξη θεραπείας με πιογλιταζόνη ή placebo. Ποδοκύτταρα στα ούρα ανιχνεύθηκαν στο 60.7% των ασθενών με ΣΔ τύπου 2 και μικρολευκωματινουρία (0.6-3.2 κύτταρα/ml) αλλά σε κανένα από τους υγιείς μάρτυρες. Δεν προέκυψε ποσοτική συσχέτιση μεταξύ ποδοκυττουρίας και λευκωματινουρίας, επιπέδων γλυκόζης αίματος και ΑΠ. Αγωγή 6 μηνών με πιογλιταζόνη (30 mg/ημέρα) οδήγησε σε σημαντική μείωση του αριθμού των ποδοκυττάρων στα ούρα και της λευκωματινουρίας ($p < 0.01$), ενώ οι ασθενείς που έλαβαν placebo δεν εμφάνισαν αντίστοιχες διαφορές. Η πιογλιταζόνη μείωσε σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, αλλά δεν επηρέασε τους δείκτες της νεφρικής λειτουργίας (κρεατινίνη και ουρία πλάσματος) και την ΑΠ [183].

Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν όταν οι ίδιοι ερευνητές εξέτασαν 50 άτομα με ΣΔ τύπου 2 και μικρολευκωματινουρία και 30 υγιείς μάρτυρες, αντίστοιχης ηλικίας

[184]. Με έναν παρόμοιο με τον παραπάνω σχεδιασμό, έγινε δειγματοληψία κατά την έναρξη της μελέτης και 6 μήνες μετά από αγωγή με διυδροχλωρική διλαζέπη ή placebo. ποδοκυττουρία ανιχνεύθηκε στο 36% μιας ομάδας ασθενών με ΣΔ τύπου 2 και μικρολευκωματινουρία (0.4-2.2 κύτταρα/ml), η οποία ελαττώθηκε σημαντικά ($p < 0.01$) μετά από αγωγή με διυδροχλωρική διλαζέπη. Επίσης, σημαντικά μειώθηκαν τα επίπεδα λευκωματινουρίας σε αυτή την ομάδα ($p < 0.05$). Η διυδροχλωρική διλαζέπη είναι ένας αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας, που αυξάνει τα επίπεδα αδενοσίνης στο εξωκυττάριο υγρό, με αποτέλεσμα να εμποδίζει τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, να καταστέλλει τη δράση της φωσφολιπάσης των αιμοπεταλίων και να διατηρεί το ρυθμό σπειραματικής διήθησης μέσω αγγειοδιαστολής και ακόλουθης αύξησης της νεφρικής αιματικής ροής. Η μείωση της ποδοκυττουρίας αλλά και της λευκωματινουρίας που παρατηρήθηκε μετά από 6 μήνες αγωγή αποδόθηκε από τους συγγραφείς στην καταστολή της υπεραντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων, στη μείωση του ανιονικού φορτίου και την αύξηση της νεφρικής αιματικής ροής [184].

Οι ίδιοι ερευνητές θέλησαν να εξετάσουν τη σχέση της ποδοκυττουρίας με το κάπνισμα σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και μικρολευκωματινουρία (n=80) και κατά πόσον η διακοπή αυτού θα την επηρέαζε [181]. Η ποδοκυττουρία ήταν συχνότερη στους (27 από 50) σε σχέση με τους μη καπνιστές (8 από 30), ενώ δεν ανιχνεύτηκε καθόλου στους υγιείς μάρτυρες (n=30). Κατόπιν, οι καπνιστές που εμφάνισαν ποδοκυττουρία χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, εκείνους που διέκοψαν τον κάπνισμα και εκείνους που επέλεξαν να συνεχίσουν να καπνίζουν. Είναι ενδιαφέρον, ότι η διακοπή του καπνίσματος οδήγησε σε μείωση και τελικά εξάλειψη των ποδοκυττάρων στα ούρα μετά από 3 χρόνια, ενώ για τους καπνιστές παρατηρήθηκε αύξηση του βαθμού ποδοκυττουρίας στο ίδιο χρονικό διάστημα [181].

Παρομοίως, η ποδοκυττουρία όπως και η πρωτεϊνουρία μειώθηκε σημαντικά ($p < 0.01$ και $p < 0.001$, αντίστοιχα) μετά από LDL αφαίρεση σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και νεφρωσικό σύνδρομο στα πλαίσια ΔΝΝ (n = 10) [182].

8.7 Η σημασία της παρούσας μελέτης

Τα παραπάνω προδίδουν περαιτέρω βαρύτητα στην παρούσα μελέτη. Προκειμένου να τεκμηριωθεί μια πιθανή σχέση μεταξύ της ανίχνευσης ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα με την παρουσία ΣΔ είναι σημαντικό είναι σημαντικό να έχει εξαλειφθεί η πιθανή επίδραση άλλων παραγόντων. Κάποιοι από αυτους τους παράγοντες είναι η ηλικία και συννοσηρότητες όπως η υπέρταση, η παχυσαρκία, οι δυσλιπιδαιμίες και άλλοι.

Σε καμία από τις παραπάνω μελέτες δε δόθηκαν στοιχεία όσον αφορά τις συννοσηρότητες των ασθενών. και δεν έγινε πολυπαραγοντική ανάλυση που αναδεικνύει το ΣΔ ως το μόνο σημαντικό παράγοντα

8.8 Περιορισμοί της μελέτης

Η παρούσα μελέτης είναι ουσιαστικά μία μελέτη επιπολασμού (cross sectional study). Αποδεικνύεται μια σχέση μεταξύ της παρουσίας ΣΔ και της παρουσίας ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα. Ο σχεδιασμός της μελέτης δε μας επιτρέπει να γνωρίζουμε κατα πόσον 1) η παρουσία αυτών των δεικτών σχετίζεται με ιστοπαθολογία του νεφρού και 2) τα άτομα αυτά θα εμφανίσουν κλινικώς σημαντική ΔΝΝ και 3) κάποια παρέμβαση μπορεί να έχει ωφέλιμη δράση.

8.9 Το μέλλον

Η κεντρική ιδεά της παρούσης μελέτης είναι η ανίχνευση της ποδοκυτταρικής βλάβης στα ούρα ασθενών με ΣΔ και φαινομενικά φυσιολογική νεφρική λειτουργία και τα ευρήματα θέτουν νέα ερευνητικά ερωτήματα που χρήζουν απάντησης. Είναι λοιπόν απαραίτητο να προσδιοριστεί η κλινική (διαγνωστική και προγνωστική) σημασία της παρουσίας ποδοκυτταρικών δεικτών στα ούρα. Έως εκ τούτου είναι σημαντικό τέτοια ευρήματα στα ούρα να συσχετιστούν με σύγχρονα ιστολογικά δεδομένα. Υπάρχουν ήδη κάποια δεδομένα σε άλλες σπειραματοπάθειες που συνδέουν την ποδοκυττουρία με τη βαρύτητα της νεφρικής προσβολής σε ιστολογικό επίπεδο [172]. Η συσχέτιση αυτών των ευρημάτων στα πλαίσια του ΣΔ είναι εξίσου σημαντική.

Ταυτόχρονα, είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός προοπτικών μελετών με σκοπό την παρακολούθηση των διαβητικών (καθώς και των μη διαβητικών) σε βάθος χρόνου ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο τα άτομα που εμφανίζουν δείκτες ποδοκυτταρικούς ή ολόκληρα ποδοκύτταρα στα ούρα αναπτύσσουν κλινικά σημαντική νεφρική νόσο. Περαιτέρω ενδιαφέρον παρουσιάζει το ερώτημα κατά πόσον και εάν το παραπάνω ισχύει, ο βαθμός της ποδοκυττουρίας σχετίζεται με την πρόγνωση της νόσου πχ. με την πιθανότητα εξέλιξης σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο. Το σημαντικότερο των ερωτημάτων, τέλος, είναι το κατά πόσο μια θεραπευτική παρέμβαση πχ με τη χορήγηση φαρμακευτικής αναστολής του ΣΡΑΑ σε άτομα με δείκτες ποδοκυτταρικής προσβολής στα ούρα αλλά νορμολευκωματινουρία (πριν δηλ. το στάδιο κλινικής δι'αγνωσης ΔΝΝ) μπορεί να αναχαιτίσει την υποκλινική νεφρική προσβολή και να καθυστερήσει την εμφάνιση λευκωματινουρίας ή πιο μακροπρόθεσμα την εξέλιξη σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο.

9. Βιβλιογραφία

[1] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association 1998;15:539-53.

[2] Standards of medical care in diabetes-2015: summary of revisions. Diabetes Care 2015;38 Suppl:S4.

[3] Standards of Medical Care in Diabetes—2015. Diabetes Care 2015;38 Suppl:S1-2.

[4] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas update poster, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation 2015.

[5] American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2014. Diabetes Care 2014;37 Suppl 1:S14-80.

[6] Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet 1998;352:854-65.

[7] Hanssen KF, Bangstad HJ, Brinchmann-Hansen O, Dahl-Jorgensen K. Blood glucose control and diabetic microvascular complications: long-term effects of near-normoglycaemia. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association 1992;9:697-705.

[8] Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. N Engl J Med 2000;342:381-9.

[9] Collins AJ, Foley RN, Herzog C, Chavers B, Gilbertson D, Herzog C, et al. US Renal Data System 2012 Annual Data Report. Am J Kidney Dis 2013;61:A7, e1-476.

[10] de Boer IH, Rue TC, Hall YN, Heagerty PJ, Weiss NS, Himmelfarb J. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. Jama 2011;305:2532-9.

[11] KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. Am J Kidney Dis 2007;49:S12-154.

[12] Jensen JS, Clausen P, Borch-Johnsen K, Jensen G, Feldt-Rasmussen B. Detecting microalbuminuria by urinary albumin/creatinine concentration ratio. Nephrol Dial Transplant 1997;12 Suppl 2:6-9.

[13] Ruggenenti P, Remuzzi G. Time to abandon microalbuminuria? Kidney Int 2006;70:1214-22.

[14] Anavekar NS, Gans DJ, Berl T, Rohde RD, Cooper W, Bhaumik A, et al. Predictors of cardiovascular events in patients with type 2 diabetic nephropathy and hypertension: a case for albuminuria. Kidney international Supplement 2004:S50-5.

[15] Karalliedde J, Viberti G. Microalbuminuria and cardiovascular risk. Am J Hypertens 2004;17:986-93.

[16] Karalliedde J, Viberti G. Hypertension and microalbuminuria: risk factors for cardiovascular disease in diabetes. Current hypertension reports 2005;7:1-2.

[17] Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. The Journal of clinical investigation 2006;116:288-96.

[18] Krolewski AS, Niewczas MA, Skupien J, Gohda T, Smiles A, Eckfeldt JH, et al. Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progression to macroalbuminuria. Diabetes Care 2014;37:226-34.

[19] Garg JP, Bakris GL. Microalbuminuria: marker of vascular dysfunction, risk factor for cardiovascular disease. Vascular medicine 2002;7:35-43.

[20] Klausen K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen G, Clausen P, Scharling H, et al. Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. Circulation 2004;110:32-5.

[21] de Boer IH, Rue TC, Cleary PA, Lachin JM, Molitch ME, Steffes MW, et al. Long-term renal outcomes of patients with type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria: an analysis of the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications cohort. Archives of internal medicine 2011;171:412-20.

[22] Molitch ME, Steffes M, Sun W, Rutledge B, Cleary P, de Boer IH, et al. Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study. Diabetes Care 2010;33:1536-43.

[23] Group DER, de Boer IH, Sun W, Cleary PA, Lachin JM, Molitch ME, et al. Intensive diabetes therapy and glomerular filtration rate in type 1 diabetes. N Engl J Med 2011;365:2366-76.

[24] Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. The Journal of clinical investigation 1997;99:342-8.

[25] Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. N Engl J Med 1984;311:89-93.

[26] Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Smidt UM, Parving HH. Progression of diabetic nephropathy. Kidney Int 2001;59:702-9.

[27] Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. N Engl J Med 1993;329:1456-62.

[28] Laffel LM, McGill JB, Gans DJ. The beneficial effect of angiotensin-converting enzyme inhibition with captopril on diabetic nephropathy in normotensive IDDM patients with microalbuminuria. North American Microalbuminuria Study Group. The American journal of medicine 1995;99:497-504.

[29] Remuzzi G, Macia M, Ruggenenti P. Prevention and treatment of diabetic renal disease in type 2 diabetes: the BENEDICT study. J Am Soc Nephrol 2006;17:S90-7.

[30] Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Lancet 2000;355:253-9.

[31] Bilous R, Chaturvedi N, Sjolie AK, Fuller J, Klein R, Orchard T, et al. Effect of candesartan on microalbuminuria and albumin excretion rate in diabetes: three randomized trials. Annals of internal medicine 2009;151:11-20, W3-4.

[32] Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. N Engl J Med 2001;345:851-60.

[33] Mathieson PW. Update on the podocyte. Curr Opin Nephrol Hypertens 2009;18:206-11.

[34] Giardino L, Armelloni S, Corbelli A, Mattinzoli D, Zennaro C, Guerrot D, et al. Podocyte glutamatergic signaling contributes to the function of the glomerular filtration barrier. J Am Soc Nephrol 2009;20:1929-40.

[35] Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, Calvaresi N, Corbelli A, Giardino LA, et al. Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2006;20:976-8.

[36] Saleem MA, Zavadil J, Bailly M, McGee K, Witherden IR, Pavenstadt H, et al. The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. Am J Physiol Renal Physiol 2008;295:F959-70.
[37] Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. Trends in cell biology 2007;17:428-37.
[38] Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. Molecular cell 1998;1:575-82.
[39] Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Ofverstedt LG, Skoglund U, Obrink B, Wartiovaara J, et al. Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions. The American journal of pathology 2003;163:2337-46.
[40] Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. J Am Soc Nephrol 2003;14:918-26.
[41] Patrakka J, Kestila M, Wartiovaara J, Ruotsalainen V, Tissari P, Lenkkeri U, et al. Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients. Kidney Int 2000;58:972-80.
[42] Doublier S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, Deferrari G, et al. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. Diabetes 2003;52:1023-30.
[43] Luimula P, Ahola H, Wang SX, Solin ML, Aaltonen P, Tikkanen I, et al. Nephrin in experimental glomerular disease. Kidney Int 2000;58:1461-8.
[44] Hingorani SR, Finn LS, Kowalewska J, McDonald RA, Eddy AA. Expression of nephrin in acquired forms of nephrotic syndrome in childhood. Pediatric nephrology 2004;19:300-5.
[45] Wernerson A, Duner F, Pettersson E, Widholm SM, Berg U, Ruotsalainen V, et al. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. Nephrol Dial Transplant 2003;18:70-6.
[46] Saran AM, Yuan H, Takeuchi E, McLaughlin M, Salant DJ. Complement mediates nephrin redistribution and actin dissociation in experimental membranous nephropathy. Kidney Int 2003;64:2072-8.

[47] Dijkman HB, Gerlofs-Nijland ME, van der Laak JA, Wetzels JF, Groenen PJ, Assmann KJ. Podocyte changes after induction of acute albuminuria in mice by anti-aminopeptidase A mAb. Nephron Exp Nephrol 2003;94:e85-93.

[48] Coward RJ, Foster RR, Patton D, Ni L, Lennon R, Bates DO, et al. Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes. J Am Soc Nephrol 2005;16:629-37.

[49] Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. J Am Soc Nephrol 2003;14:2063-71.

[50] Aaltonen P, Luimula P, Astrom E, Palmen T, Gronholm T, Palojoki E, et al. Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 2001;81:1185-90.

[51] Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z. Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. Diabetologia 2001;44:874-7.

[52] Davis BJ, Cao Z, de Gasparo M, Kawachi H, Cooper ME, Allen TJ. Disparate effects of angiotensin II antagonists and calcium channel blockers on albuminuria in experimental diabetes and hypertension: potential role of nephrin. Journal of hypertension 2003;21:209-16.

[53] Benigni A, Gagliardini E, Tomasoni S, Abbate M, Ruggenenti P, Kalluri R, et al. Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. Kidney Int 2004;65:2193-200.

[54] Coward RJ, Welsh GI, Yang J, Tasman C, Lennon R, Koziell A, et al. The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action. Diabetes 2005;54:3095-102.

[55] Huber TB, Hartleben B, Kim J, Schmidts M, Schermer B, Keil A, et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. Molecular and cellular biology 2003;23:4917-28.

[56] Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. The Journal of biological chemistry 2001;276:41543-6.

[57] Simons M, Schwarz K, Kriz W, Miettinen A, Reiser J, Mundel P, et al. Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm. The American journal of pathology 2001;159:1069-77.

[58] Verma R, Wharram B, Kovari I, Kunkel R, Nihalani D, Wary KK, et al. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. The Journal of biological chemistry 2003;278:20716-23.

[59] Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. Nature genetics 2000;24:349-54.

[60] Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attie T, et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. The American journal of pathology 2002;160:131-9.

[61] Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. The Journal of clinical investigation 2001;108:1621-9.

[62] Sellin L, Huber TB, Gerke P, Quack I, Pavenstadt H, Walz G. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2003;17:115-7.

[63] Liu XL, Done SC, Yan K, Kilpelainen P, Pikkarainen T, Tryggvason K. Defective trafficking of nephrin missense mutants rescued by a chemical chaperone. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2004;15:1731-8.

[64] Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Moriniere V, Tete MJ, Legendre C, et al. NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. Kidney Int 2004;66:571-9.

[65] Karle SM, Uetz B, Ronner V, Glaeser L, Hildebrandt F, Fuchshuber A. Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome. J Am Soc Nephrol 2002;13:388-93.

[66] Roselli S, Heidet L, Sich M, Henger A, Kretzler M, Gubler MC, et al. Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. Molecular and cellular biology 2004;24:550-60.

[67] Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, Li J, Bromley S, Desai N, et al. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. Cell 1998;94:667-77.

[68] Kirsch KH, Georgescu MM, Ishimaru S, Hanafusa H. CMS: an adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1999;96:6211-6.

[69] Levidiotis V, Power DA. New insights into the molecular biology of the glomerular filtration barrier and associated disease. Nephrology 2005;10:157-66.

[70] Huber TB, Simons M, Hartleben B, Sernetz L, Schmidts M, Gundlach E, et al. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. Human molecular genetics 2003;12:3397-405.

[71] Huber TB, Kwoh C, Wu H, Asanuma K, Godel M, Hartleben B, et al. Bigenic mouse models of focal segmental glomerulosclerosis involving pairwise interaction of CD2AP, Fyn, and synaptopodin. The Journal of clinical investigation 2006;116:1337-45.

[72] Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. Science 1999;286:312-5.

[73] Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, Shimizu F, Sakai T, Kobayashi T, et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. Kidney Int 2001;59:1003-12.

[74] Moeller MJ, Soofi A, Braun GS, Li X, Watzl C, Kriz W, et al. Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization. The EMBO journal 2004;23:3769-79.

[75] Ciani L, Patel A, Allen ND, ffrench-Constant C. Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. Molecular and cellular biology 2003;23:3575-82.

[76] Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. J Am Soc Nephrol 2000;11:1-8.

[77] Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, Rayburn H, Chodosh LA, Takeichi M, et al. Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. The Journal of cell biology 1997;139:1025-32.

[78] Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. Molecular and cellular biology 2001;21:4829-36.

[79] Barletta GM, Kovari IA, Verma RK, Kerjaschki D, Holzman LB. Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. The Journal of biological chemistry 2003;278:19266-71.
[80] Huber TB, Schmidts M, Gerke P, Schermer B, Zahn A, Hartleben B, et al. The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1. The Journal of biological chemistry 2003;278:13417-21.
[81] Reiser J, Polu KR, Moller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. Nature genetics 2005;37:739-44.
[82] Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. Science 2005;308:1801-4.
[83] Adler S. Integrin receptors in the glomerulus: potential role in glomerular injury. The American journal of physiology 1992;262:F697-704.
[84] Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, Rennke H, Shepherd K, Jones RC, et al. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. Development 1996;122:3537-47.
[85] Fassler R, Meyer M. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. Genes & development 1995;9:1896-908.
[86] Kojima K, Davidovits A, Poczewski H, Langer B, Uchida S, Nagy-Bojarski K, et al. Podocyte flattening and disorder of glomerular basement membrane are associated with splitting of dystroglycan-matrix interaction. J Am Soc Nephrol 2004;15:2079-89.
[87] Vogtlander NP, Tamboer WP, Bakker MA, Campbell KP, van der Vlag J, Berden JH. Reactive oxygen species deglycosilate glomerular alpha-dystroglycan. Kidney Int 2006;69:1526-34.
[88] Mundel P. [Synaptopodin: an actin-associated protein of telencephalic dendrites and of podocytes in the kidney glomerulus]. Ann Anat 1998;180:391-2.
[89] Deller T, Korte M, Chabanis S, Drakew A, Schwegler H, Stefani GG, et al. Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003;100:10494-9.
[90] Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. Nature cell biology 2006;8:485-91.

[91] Smoyer WE, Mundel P, Gupta A, Welsh MJ. Podocyte alpha-actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephrotic syndrome. The American journal of physiology 1997;273:F150-7.

[92] Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. Nature genetics 2000;24:251-6.

[93] Michaud JL, Lemieux LI, Dube M, Vanderhyden BC, Robertson SJ, Kennedy CR. Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. J Am Soc Nephrol 2003;14:1200-11.

[94] Michaud JL, Chaisson KM, Parks RJ, Kennedy CR. FSGS-associated alpha-actinin-4 (K256E) impairs cytoskeletal dynamics in podocytes. Kidney Int 2006;70:1054-61.

[95] Takeda T. Podocyte cytoskeleton is connected to the integral membrane protein podocalyxin through Na+/H+-exchanger regulatory factor 2 and ezrin. Clinical and experimental nephrology 2003;7:260-9.

[96] Doyonnas R, Kershaw DB, Duhme C, Merkens H, Chelliah S, Graf T, et al. Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. The Journal of experimental medicine 2001;194:13-27.

[97] Palmer RE, Kotsianti A, Cadman B, Boyd T, Gerald W, Haber DA. WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin. Current biology : CB 2001;11:1805-9.

[98] Wagner N, Wagner KD, Scholz H, Kirschner KM, Schedl A. Intermediate filament protein nestin is expressed in developing kidney and heart and might be regulated by the Wilms' tumor suppressor Wt1. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology 2006;291:R779-87.

[99] Guo JK, Menke AL, Gubler MC, Clarke AR, Harrison D, Hammes A, et al. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. Human molecular genetics 2002;11:651-9.

[100] Wagner KD, Wagner N, Schedl A. The complex life of WT1. Journal of cell science 2003;116:1653-8.

[101] Mundel P, Shankland S. Podocyte biology and response to injury. J Am Soc Nephrol 2002;13:3005-15.

[102] Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar AP, Thomazelli FC, Matos JD, Canani LH. Diabetic nephropathy. Diabetol Metab Syndr 2009;1:10.

[103] Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol 2010;21:556-63.

[104] Haas M. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis. Archives of pathology & laboratory medicine 2009;133:224-32.

[105] Working Group of the International Ig ANN, the Renal Pathology S, Cattran DC, Coppo R, Cook HT, Feehally J, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. Kidney Int 2009;76:534-45.

[106] Stout LC, Kumar S, Whorton EB. Insudative lesions--their pathogenesis and association with glomerular obsolescence in diabetes: a dynamic hypothesis based on single views of advancing human diabetic nephropathy. Human pathology 1994;25:1213-27.

[107] Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. Kidney Int 1996;50:1089-100.

[108] Tracy RE, Strong JP, Newman WP, 3rd, Malcom GT, Oalmann MC, Guzman MA. Renovasculopathies of nephrosclerosis in relation to atherosclerosis at ages 25 to 54 years. Kidney Int 1996;49:564-70.

[109] Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? Kidney Int 1998;54:687-97.

[110] Verma R, Kovari I, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman LB. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. The Journal of clinical investigation 2006;116:1346-59.

[111] Reiser J, Sever S. Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease. Annual review of medicine 2013;64:357-66.

[112] Forbes JM, Fukami K, Cooper ME. Diabetic nephropathy: where hemodynamics meets metabolism. Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association 2007;115:69-84.

[113] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 2001;414:813-20.

[114] Fukami K, Yamagishi S, Ueda S, Okuda S. Role of AGEs in diabetic nephropathy. Curr Pharm Des 2008;14:946-52.

[115] Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. The American journal of pathology 2003;162:1123-37.

[116] Figarola JL, Scott S, Loera S, Tessler C, Chu P, Weiss L, et al. LR-90 a new advanced glycation endproduct inhibitor prevents progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-diabetic rats. Diabetologia 2003;46:1140-52.

[117] Peppa M, Brem H, Cai W, Zhang JG, Basgen J, Li Z, et al. Prevention and reversal of diabetic nephropathy in db/db mice treated with alagebrium (ALT-711). Am J Nephrol 2006;26:430-6.

[118] Ruster C, Bondeva T, Franke S, Tanaka N, Yamamoto H, Wolf G. Angiotensin II upregulates RAGE expression on podocytes: role of AT2 receptors. Am J Nephrol 2009;29:538-50.

[119] Brosius FC, 3rd. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy. Reviews in endocrine & metabolic disorders 2008;9:245-54.

[120] Toth-Manikowski S, Atta MG. Diabetic Kidney Disease: Pathophysiology and Therapeutic Targets. Journal of diabetes research 2015;2015:697010.

[121] Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, et al. NF-kappaB in renal inflammation. J Am Soc Nephrol 2010;21:1254-62.

[122] Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2004;19:2505-12.

[123] Mifsud SA, Allen TJ, Bertram JF, Hulthen UL, Kelly DJ, Cooper ME, et al. Podocyte foot process broadening in experimental diabetic nephropathy: amelioration with renin-angiotensin blockade. Diabetologia 2001;44:878-82.

[124] Philips JC, Weekers L, Scheen AJ. [Clinical study of the month. The CALM study assessing the combination of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist in the treatment of diabetic nephropathy]. Revue medicale de Liege 2001;56:126-8.

[125] Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Thomson NM, Holthofer H, Zaoui P, et al. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. Diabetologia 2002;45:1572-6.

[126] Lewis EJ, Lewis JB. Treatment of diabetic nephropathy with angiotensin II receptor antagonist. Clinical and experimental nephrology 2003;7:1-8.

[127] Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. Kidney Int 2004;65:30-9.

[128] Petermann AT, Pippin J, Durvasula R, Pichler R, Hiromura K, Monkawa T, et al. Mechanical stretch induces podocyte hypertrophy in vitro. Kidney Int 2005;67:157-66.

[129] Endlich N, Kress KR, Reiser J, Uttenweiler D, Kriz W, Mundel P, et al. Podocytes respond to mechanical stress in vitro. J Am Soc Nephrol 2001;12:413-22.

[130] Martineau LC, McVeigh LI, Jasmin BJ, Kennedy CR. p38 MAP kinase mediates mechanically induced COX-2 and PG EP4 receptor expression in podocytes: implications for the actin cytoskeleton. Am J Physiol Renal Physiol 2004;286:F693-701.

[131] Durvasula RV, Shankland SJ. Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose. Am J Physiol Renal Physiol 2008;294:F830-9.

[132] Xu ZG, Miao LN, Cui YC, Jia Y, Yuan H, Wu M. Angiotensin II type 1 receptor expression is increased via 12-lipoxygenase in high glucose-stimulated glomerular cells and type 2 diabetic glomeruli. Nephrol Dial Transplant 2009;24:1744-52.

[133] Parving HH, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Hollenberg NK, Investigators AS. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. N Engl J Med 2008;358:2433-46.

[134] Dilauro M, Burns KD. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. ScientificWorldJournal 2009;9:522-35.

[135] Reich HN, Oudit GY, Penninger JM, Scholey JW, Herzenberg AM. Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease. Kidney Int 2008;74:1610-6.

[136] Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, et al. Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls. Am J Kidney Dis 2008;51:613-23.

[137] Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, et al. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. Hypertension 2003;41:392-7.

[138] Leehey DJ, Singh AK, Bast JP, Sethupathi P, Singh R. Glomerular renin angiotensin system in streptozotocin diabetic and Zucker diabetic fatty rats. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine 2008;151:208-16.

[139] Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Batlle D. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. J Am Soc Nephrol 2006;17:3067-75.

[140] Soler MJ, Wysocki J, Ye M, Lloveras J, Kanwar Y, Batlle D. ACE2 inhibition worsens glomerular injury in association with increased ACE expression in streptozotocin-induced diabetic mice. Kidney Int 2007;72:614-23.

[141] Tikellis C, Bialkowski K, Pete J, Sheehy K, Su Q, Johnston C, et al. ACE2 deficiency modifies renoprotection afforded by ACE inhibition in experimental diabetes. Diabetes 2008;57:1018-25.

[142] Wong DW, Oudit GY, Reich H, Kassiri Z, Zhou J, Liu QC, et al. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury. The American journal of pathology 2007;171:438-51.

[143] Golbetz H, Black V, Shemesh O, Myers BD. Mechanism of the antiproteinuric effect of indomethacin in nephrotic humans. The American journal of physiology 1989;256:F44-51.

[144] Velosa JA, Torres VE. Benefits and risks of nonsteroidal antiinflammatory drugs in steroid-resistant nephrotic syndrome. Am J Kidney Dis 1986;8:345-50.

[145] Vriesendorp R, de Zeeuw D, de Jong PE, Donker AJ, Pratt JJ, van der Hem GK. Reduction of urinary protein and prostaglandin E2 excretion in the nephrotic syndrome by non-steroidal anti-inflammatory drugs. Clinical nephrology 1986;25:105-10.

[146] Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenase-2 expression in cultured cortical thick ascending limb of Henle increases in response to decreased extracellular ionic content

by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Role of p38-mediated pathways. The Journal of biological chemistry 2002;277:45638-43.

[147] Hirose S, Yamamoto T, Feng L, Yaoita E, Kawasaki K, Goto S, et al. Expression and localization of cyclooxygenase isoforms and cytosolic phospholipase A2 in anti-Thy-1 glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 1998;9:408-16.

[148] Srivastava T, McCarthy ET, Sharma R, Kats A, Carlton CG, Alon US, et al. Fluid flow shear stress upregulates prostanoid receptor EP2 but not EP4 in murine podocytes. Prostaglandins & other lipid mediators 2013;104-105:49-57.

[149] Bek M, Nusing R, Kowark P, Henger A, Mundel P, Pavenstadt H. Characterization of prostanoid receptors in podocytes. J Am Soc Nephrol 1999;10:2084-93.

[150] Benigni A, Zoja C, Tomasoni S, Campana M, Corna D, Zanchi C, et al. Transcriptional regulation of nephrin gene by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist: molecular mechanism of the antiproteinuric effect of pioglitazone. J Am Soc Nephrol 2006;17:1624-32.

[151] Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, et al. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. The Journal of clinical investigation 2008;118:1645-56.

[152] Ho J, Ng KH, Rosen S, Dostal A, Gregory RI, Kreidberg JA. Podocyte-specific loss of functional microRNAs leads to rapid glomerular and tubular injury. J Am Soc Nephrol 2008;19:2069-75.

[153] Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. Curr Diabetes Rev 2008;4:39-45.

[154] Viberti G, Wheeldon NM, MicroAlbuminuria Reduction With VSI. Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus: a blood pressure-independent effect. Circulation 2002;106:672-8.

[155] Comparison between perindopril and nifedipine in hypertensive and normotensive diabetic patients with microalbuminuria. Melbourne Diabetic Nephropathy Study Group. Bmj 1991;302:210-6.

[156] Group ACEIiDNT. Should all patients with type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria receive angiotensin-converting enzyme inhibitors? A meta-analysis of individual patient data. Annals of internal medicine 2001;134:370-9.

[157] Mauer M, Zinman B, Gardiner R, Suissa S, Sinaiko A, Strand T, et al. Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. N Engl J Med 2009;361:40-51.

[158] Shimizu M, Furuichi K, Toyama T, Kitajima S, Hara A, Kitagawa K, et al. Long-term outcomes of Japanese type 2 diabetic patients with biopsy-proven diabetic nephropathy. Diabetes Care 2013;36:3655-62.

[159] Perkins BA, Ficociello LH, Ostrander BE, Silva KH, Weinberg J, Warram JH, et al. Microalbuminuria and the risk for early progressive renal function decline in type 1 diabetes. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2007;18:1353-61.

[160] Steffes MW, Schmidt D, McCrery R, Basgen JM, International Diabetic Nephropathy Study G. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. Kidney Int 2001;59:2104-13.

[161] Dalla Vestra M, Masiero A, Roiter AM, Saller A, Crepaldi G, Fioretto P. Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. Diabetes 2003;52:1031-5.

[162] White KE, Bilous RW, Diabiopsies Study G. Structural alterations to the podocyte are related to proteinuria in type 2 diabetic patients. Nephrol Dial Transplant 2004;19:1437-40.

[163] Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. Diabetologia 1999;42:1341-4.

[164] Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. Kidney Int 2008;74:22-36.

[165] Stitt-Cavanagh E, MacLeod L, Kennedy C. The podocyte in diabetic kidney disease. ScientificWorldJournal 2009;9:1127-39.

[166] Teiken JM, Audettey JL, Laturnus DI, Zheng S, Epstein PN, Carlson EC. Podocyte loss in aging OVE26 diabetic mice. Anatomical record 2008;291:114-21.

[167] Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Bottinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. Diabetes 2006;55:225-33.

[168] Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. Kidney Int 2006;69:213-7.

[169] Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. The American journal of pathology 2008;172:299-308.
[170] Habara P, Mareckova H, Sopkova Z, Malickova K, Zivorova D, Zima T, et al. A novel method for the estimation of podocyte injury: podocalyxin-positive elements in urine. Folia biologica 2008;54:162-7.
[171] Hara M, Yanagihara T, Hirayama Y, Ogasawara S, Kurosawa H, Sekine S, et al. Podocyte membrane vesicles in urine originate from tip vesiculation of podocyte microvilli. Human pathology 2010;41:1265-75.
[172] Hara M, Yanagihara T, Itoh M, Matsuno M, Kihara I. Immunohistochemical and urinary markers of podocyte injury. Pediatric nephrology 1998;12:43-8.
[173] Hara M, Yanagihara T, Kihara I, Higashi K, Fujimoto K, Kajita T. Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury. J Am Soc Nephrol 2005;16:408-16.
[174] Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2000;15:1379-83.
[175] Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schonlein-Henoch purpura nephritis. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN 2007;2:231-8.
[176] Petermann AT, Krofft R, Blonski M, Hiromura K, Vaughn M, Pichler R, et al. Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable. Kidney Int 2003;64:1222-31.
[177] Jim B, Jean-Louis P, Qipo A, Garry D, Mian S, Matos T, et al. Podocyturia as a diagnostic marker for preeclampsia amongst high-risk pregnant patients. Journal of pregnancy 2012;2012:984630.
[178] Carney EF. Pre-eclampsia: Podocyturia predicts pre-eclampsia. Nature reviews Nephrology 2013;9:310.
[179] Kelder TP, Penning ME, Uh HW, Cohen D, Bloemenkamp KW, Bruijn JA, et al. Quantitative polymerase chain reaction-based analysis of podocyturia is a feasible diagnostic tool in preeclampsia. Hypertension 2012;60:1538-44.

[180] Petermann AT, Pippin J, Krofft R, Blonski M, Griffin S, Durvasula R, et al. Viable podocytes detach in experimental diabetic nephropathy: potential mechanism underlying glomerulosclerosis. Nephron Exp Nephrol 2004;98:e114-23.

[181] Nakamura T, Kawagoe Y, Koide H. Effect of cigarette smoking on urinary podocyte excretion in early diabetic nephropathy. Diabetes Care 2003;26:1324-5.

[182] Nakamura T, Kawagoe Y, Ogawa H, Ueda Y, Hara M, Shimada N, et al. Effect of low-density lipoprotein apheresis on urinary protein and podocyte excretion in patients with nephrotic syndrome due to diabetic nephropathy. Am J Kidney Dis 2005;45:48-53.

[183] Nakamura T, Ushiyama C, Osada S, Hara M, Shimada N, Koide H. Pioglitazone reduces urinary podocyte excretion in type 2 diabetes patients with microalbuminuria. Metabolism 2001;50:1193-6.

[184] Nakamura T, Ushiyama C, Shimada N, Sekizuka K, Ebihara I, Hara M, et al. Effect of the antiplatelet drug dilazep dihydrochloride on urinary podocytes in patients in the early stage of diabetic nephropathy. Diabetes Care 2000;23:1168-71.

[185] Sharma S, Bonal D, Thomas D, Belinda J. Urinary Excretion of Podocytes as an Early Marker of Diabetic Nephropathy. National Kidney Foundation 2010 Spring Clinical Meetings Abstracts2010.

[186] Sato Y, Wharram BL, Lee SK, Wickman L, Goyal M, Venkatareddy M, et al. Urine podocyte mRNAs mark progression of renal disease. J Am Soc Nephrol 2009;20:1041-52.

[187] Szeto CC, Lai KB, Chow KM, Szeto CY, Yip TW, Woo KS, et al. Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. Clin Chim Acta 2005;361:182-90.

[188] Wang G, Lai FM, Tam LS, Li KM, Lai KB, Chow KM, et al. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urinary sediment of patients with lupus nephritis. The Journal of rheumatology 2007;34:2358-64.

[189] Griffin SV, Petermann AT, Durvasula RV, Shankland SJ. Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. Nephrol Dial Transplant 2003;18 Suppl 6:vi8-13.

[190] Phillips A, Janssen U, Floege J. Progression of diabetic nephropathy. Insights from cell culture studies and animal models. Kidney Blood Press Res 1999;22:81-97.

[191] Baelde HJ, Eikmans M, Lappin DW, Doran PP, Hohenadel D, Brinkkoetter PT, et al. Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss. Kidney Int 2007;71:637-45.

[192] Turk T, Leeuwis JW, Gray J, Torti SV, Lyons KM, Nguyen TQ, et al. BMP signaling and podocyte markers are decreased in human diabetic nephropathy in association with CTGF overexpression. J Histochem Cytochem 2009;57:623-31.

[193] Craici IM, Wagner SJ, Bailey KR, Fitz-Gibbon PD, Wood-Wentz CM, Turner ST, et al. Podocyturia predates proteinuria and clinical features of preeclampsia: longitudinal prospective study. Hypertension 2013;61:1289-96.

[194] Sabino AR, Teixeira Vde P, Nishida SK, Sass N, Mansur JB, Kirsztajn GM. Detection of podocyturia in patients with lupus nephritis. J Bras Nefrol 2013;35:252-8.

[195] Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Li KT, Szeto CC. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. Nephron Clin Pract 2007;106:c169-79.

[196] Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, Yang Y, Wang F, Chowdhury M, et al. Urine podocyte mRNAs, proteinuria, and progression in human glomerular diseases. J Am Soc Nephrol 2013;24:2081-95.

[197] Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. J Am Soc Nephrol 2005;16:1733-41.

[198] Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Kwan BC, Li KT, et al. Intra-renal and urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules for the estimation of glomerular podocyte loss. Renal failure 2010;32:372-9.

[199] Jim B, Ghanta M, Qipo A, Fan Y, Chuang PY, Cohen HW, et al. Dysregulated nephrin in diabetic nephropathy of type 2 diabetes: a cross sectional study. PLoS One 2012;7:e36041.

[200] Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Kwan BC, Li PK, et al. Urinary messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in patients with diabetic nephropathy treated by angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker. Eur J Endocrinol 2008;158:317-22.

[201] Zoja C, Abbate M, Remuzzi G. Progression of chronic kidney disease: insights from animal models. Curr Opin Nephrol Hypertens 2006;15:250-7.

[202] Kaplan C, Pasternack B, Shah H, Gallo G. Age-related incidence of sclerotic glomeruli in human kidneys. The American journal of pathology 1975;80:227-34.
[203] Goyal VK. Changes with age in the human kidney. Experimental gerontology 1982;17:321-31.
[204] Kretzler M, Koeppen-Hagemann I, Kriz W. Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat. Virchows Archiv : an international journal of pathology 1994;425:181-93.
[205] Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. Am J Physiol Renal Physiol 2003;285:F40-8.
[206] Ruf RG, Schultheiss M, Lichtenberger A, Karle SM, Zalewski I, Mucha B, et al. Prevalence of WT1 mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome. Kidney Int 2004;66:564-70.
[207] Wiggins JE, Goyal M, Sanden SK, Wharram BL, Shedden KA, Misek DE, et al. Podocyte hypertrophy, "adaptation," and "decompensation" associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. J Am Soc Nephrol 2005;16:2953-66.
[208] Wanner N, Hartleben B, Herbach N, Goedel M, Stickel N, Zeiser R, et al. Unraveling the role of podocyte turnover in glomerular aging and injury. J Am Soc Nephrol 2014;25:707-16.
[209] do Nascimento JF, Canani LH, Gerchman F, Rodrigues PG, Joelsons G, dos Santos M, et al. Messenger RNA levels of podocyte-associated proteins in subjects with different degrees of glucose tolerance with or without nephropathy. BMC Nephrol 2013;14:214.
[210] Zheng M, Lv LL, Ni J, Ni HF, Li Q, Ma KL, et al. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. PLoS One 2011;6:e20431.
[211] Hara M, Yamagata K, Tomino Y, Saito A, Hirayama Y, Ogasawara S, et al. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin. Diabetologia 2012;55:2913-9.

Clinical Practice: Original Paper

nephron Clinical Practice

Nephron
DOI: 10.1159/000438493

Received: March 20, 2015
Accepted: July 8, 2015
Published online: ■■■

© S. Karger AG, Basel
PROOF Copy for personal use only
ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Increased Urinary Excretion of Podocyte Markers in Normoalbuminuric Patients with Diabetes

Eirini Lioudaki[a, c] Konstatinos G. Stylianou[c, d] Ioannis Petrakis[c, d] Georgios Kokologiannakis[c, d] Andreas Passam[c, d] Dimitri P. Mikhailidis[b] Eugene K. Daphnis[c, d] Emmanouil S. Ganotakis[e]

[a]Department of Acute Medicine, King's College Hospital and [b]Department of Clinical Biochemistry (Vascular Disease Prevention Clinics), Royal Free Hospital Campus, University College London Medical School, University College London (UCL), London, UK; [c]Laboratory of Renal Medicine, School of Medicine, [d]Department of Renal Medicine, University Hospital of Heraklion, and [e]Department of Internal Medicine, University Hospital of Heraklion, University of Crete, Heraklion, Greece

Key Words
Diabetes · Diabetic nephropathy · Podocyte

Abstract
Background: Podocyte injury plays a crucial role in the pathogenesis and progression of diabetic nephropathy (DN). We investigated whether patients with diabetes mellitus (DM) without overt DN present podocyte markers in urine suggestive of early podocyte injury. ***Methods:*** We studied 71 patients with DM type 2 and normal urine albumin excretion (UAE) and 39 non-diabetic controls. The mRNA abundance of 3 podocyte-specific markers in urinary sediment (nephrin, podocin and synaptopodin) was measured with real-time quantitative PCR. All the subjects were categorized according to their urinary podocyte marker profile into 2 groups, those with only synaptopodin mRNA presence (synaptopodin only group) and those with nephrin and/or podocin mRNA presence in addition to synaptopodin in their urine (nephrin and/or podocin group). ***Results:*** Synaptopodin mRNA was detected in the urine of all the diabetics and controls. The presence of nephrin and/or podocin mRNA in urine was more frequent among DM patients compared to controls (53.5 vs. 30.8%, respectively; $p = 0.022$). Binary logistic regression analysis revealed that the only significant predictor of the presence of nephrin and/or podocin mRNA in urine was the presence of DM (OR 2.59, 95% CI 1.14–5.91, $p = 0.024$, adjusted for all risk factors). A strong correlation between nephrin and podocin urinary mRNA levels was noted ($r = +0.796$, $p < 0.001$). ***Conclusion:*** This study demonstrated that urinary podocyte markers are more prevalent in diabetic patients with normal UAE compared to controls, and this may reflect early podocyte injury. DM is the only significant determinant of the presence of nephrin and/or podocin mRNA in urine in this population. Therefore, urinary podocyte markers may emerge as a valuable tool in the early diagnosis of DN.

© 2015 S. Karger AG, Basel

Introduction

Diabetic nephropathy (DN) is the leading cause of end-stage renal disease in the developed world and is associated with significant cardiovascular morbidity and

KARGER 125

© 2015 S. Karger AG, Basel
1660–8151/15/0000–0000$39.50/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/nef

Dr. Eirini Lioudaki
5 Queensland Road
London N77FE (UK)
E-Mail eirini.lioudaki1@nhs.net

mortality [1, 2]. In the majority of cases, DN is characterized by persistent increased urinary albumin excretion (UAE), which is used as a marker for the diagnosis, though spontaneous remission of UAE levels 30–299 mg/g has also been observed in a significant proportion of patients [3, 4]. Up to 40% of patients with any type of diabetes mellitus (DM) will develop DN manifested as increased albumin excretion, decreased glomerular filtration rate or both [5]. Glomerular podocyte injury (i.e., foot process hypertrophy or effacement, epithelial-to-mesenchymal transition, apoptosis and detachment) is believed to play an important role in the pathogenesis and progression of DN [6]. Findings from experimental models have suggested that podocyte insult in DM may be mediated by several mechanisms such as neurohormonal changes, oxidative stress and diminished expression of adhesion molecules [7, 8]. There are histological data describing several degrees of podocyte injury in DM, ranging from alterations in expression of podocyte proteins to actual cell apoptosis [9–12]. Despite there being no significant morphological differences identified in podocytes in patients with diabetes and normoalbuminuria compared with non-diabetics [13, 14], it appears that the podocyte density in glomeruli reduces since the early stages of diabetic kidney and prior to the development of proteinuria [14].

The detection of podocytes or podocyte-associated molecules in the urine of patients with DN is also indicative of podocyte damage in DM [15–21].

The aim of the present study is to examine the presence of podocyte-associated molecules in the urine of patients with DM and normal UAE, that is, without overt DN and potential associations with other factors besides DM.

Materials and Methods

Study Population

We studied 80 patients with type 2 DM who were examined at the Diabetes Clinic of the University Hospital of Heraklion, Crete, from January to June 2011. Exclusion criteria were (1) history of renal disease, (2) history of micro or macroalbuminuria, (3) presence of urinary infection, (4) known duration of DM <1 year and (5) use of nephrotoxic medication. We also studied 50 non-diabetic controls, some of whom were followed up in the metabolic clinic for hypertension (HTN) and/or hyperlipidemia without known renal disease. Exclusion criteria for control subjects were (1) history of DM, impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose, (2) history of renal disease, (3) history of micro/macroalbuminuria, (4) presence of urinary infection and (5) use of nephrotoxic medication. All the participants gave written consent, and the protocol was approved by University of Crete Committee on Ethics. All the subjects were categorized according to their urinary podocyte marker profile into 2 groups: those with only synaptopodin mRNA presence (synaptopodin only) and those with nephrin and/or podocin mRNA presence in addition to synaptopodin in their urine (nephrin and/or podocin group). Data regarding smoking habit, current medication and medical history were recorded. The weight, height and waist circumference were measured and body mass index was calculated. Blood samples were collected in the morning after a 12-hour overnight fast. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated according to the CKD-EPI formula [22]. Urine samples were collected for measurement of nephrin, podocin and synaptopodin mRNA as well as albumin, protein and creatinine levels. Nephrin, podocin and synaptopodin mRNA levels were normalized to urinary creatinine concentration.

Collection of Urine Samples and Total RNA Extraction

A whole-stream early-morning urine specimen was collected from each participant. Within 1 hour after collection, the urine was centrifuged at 3,500 rpm for 30 minutes and at 13,000 rpm for 5 minutes at 4°C. The supernatant was discarded, and the urinary cell pellet was lysed by RNA lysis buffer (Qiagen Inc., Ontario, Canada). Specimens were stored at –80°C until use. RNeasy minikits (Qiagen Inc.) were used to extract total RNA according to the manufacturer's protocol. We confirmed the purity of the RNA by the relative absorbance ratio at 260/280 nm using a spectrometer, the Nanodrop 2000c (Thermo-Scientific, Del., USA).

Reverse Transcription

For reverse transcription, 2 μl of the total RNA was mixed with 1 μl of 10 mM dNTP mix, 100 ng of random hexamers (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA) and sterile, distilled water to 13 μl. The mixture was heated to 65°C for 5 minutes and incubated on ice for at least 1 minute. Then, 4 μl of 5X first-strand buffer, 1 μl of 0.1 M DTT, 1 μl of RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor and 1 μl of SuperScript™ III RT (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA) were added, and the mixture was incubated at 25°C for 5 minutes, at 50°C for 60 minutes and, finally, at 70°C for 15 minutes. The complementary DNA was stored at –80°C until use.

Real-Time PCR

The urinary mRNA levels of nephrin, podocin and synaptopodin as markers of podocyte injury were quantified by real-time PCR with ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) using iTaq™ SYBR® Green supermix with ROX (Bio-Rad, Calif., USA). The samples were cycled 40 times at 95°C for 15 seconds and at 60°C for 60 seconds. All samples were run in duplicate. GAPDH mRNA levels were used as a housekeeping gene to normalize the mRNA level of each target gene. The following sequences of oligonucleotide primers were used: nephrin: forward 5′-CAA CTG GGA GAG ACT GGG AGA A-3′, reverse 5′-AAT CTG ACA ACA AGA CGG AGC A-3′, podocin: forward 5′-AAG AGT AAT TAT ATT CCG ACT GGG ACA T-3′, reverse 5′-TGG TCA CGA TCT CAT GAA AAG G-3′, synaptopodin: forward 5′-CCC AAG GTG ACC CCG AAT-3′, reverse 5′-CTG CCG CCG CTT CTC A-3′ and GAPDH: forward 5′-TGG TCA CCA GGG CTG CTT T-3′, reverse 5′-AGC TTC CCG TTC TCA GCC T-3′. Then, dissociation curves and melting temperatures were recorded. The standard curve method was used for quantification, made by a 10-fold serial dilution of human kidney complementary DNA.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the IBM SPSS 20. Non-normally distributed values were expressed as median (range) or were transformed to their natural logarithm values, and normally distributed values were expressed as mean ± SEM. A p value <0.05 was considered statistically significant. Between-group comparisons were assessed for nominal variables with the Chi-square test and by Kruskal–Wallis test. Spearman's rank test and Pearson correlation were used to determine correlations between variables. Binary logistic regression analysis was used to assess the predictors for the presence of nephrin and/or podocin mRNA in the urine.

Results

Initially, 80 patients with DM type 2 and 50 non-diabetic controls were recruited. Nine diabetic patients and 11 controls were found to have an increased UAE (urine albumin to creatine ratio (ACR) >20 mg/g measured on enrollment) and, therefore, were not included in analysis. Overall, we studied 71 patients with type 2 DM and 39 non-diabetic controls, all with normal UAE. The demographic, clinical and laboratory data are presented in table 1. Diabetic and control groups differed in the presence of hypercholesterolemia ($p < 0.001$), hypertriglyceridemia ($p = 0.003$), central obesity ($p = 0.002$) and HTN ($p = 0.003$), namely, factors pathogenetically associated with DM. Both the groups also differed from each other in smoking status ($p = 0.04$), reflecting lifestyle measures taken as part of cardiovascular risk management in diabetics. Real-time PCR measurements showed that synaptopodin mRNA was present in the urine of all the patients and controls, while this was not the case for nephrin and podocin.

Nephrin mRNA levels were higher in patients with type 2 DM compared to controls ($p = 0.035$). Podocin mRNA levels were also higher in diabetic patients compared to controls, but this association was only marginally significant ($p = 0.058$). The synaptopodin mRNA levels did not differ between the 2 groups. When mRNA levels were normalized with urine creatinine concentration, all 3 relationships became non-significant (fig. 1–3). Notably, the presence of nephrin and/or podocin mRNA in the urine was more frequent (fig. 4) among diabetics compared with controls (53.5 vs. 30.8%, respectively; $p = 0.022$).

Subjects were then divided according to their podocyte marker profile into synaptopodin-only group and nephrin and/or podocin group, independent of the DM status. The comparisons between the 2 groups are listed in table 2. The nephrin and/or podocin group differed significantly from the synaptopodin-only group only with regard to DM presence. Of particular interest is that synaptopodin mRNA levels were positively associated with eGFR ($r = +0.194$, $p = 0.043$), but inversely correlated with podocin mRNA excretion ($r = -0.470$, $p = 0.05$). Furthermore, there was a strong correlation between nephrin and podocin urinary mRNA levels ($r = 0.796$, $p < 0.001$). The relation between nephrin and synaptopodin though did not reach significance but showed a tendency toward a negative correlation.

Equally important is the fact that on binary logistic regression analysis, DM was the only significant determinant of the presence of nephrin and/or podocin mRNA in the urine with diabetic patients exhibiting a 2.6-fold higher risk as compared to their non-diabetic counterparts (OR 2.59, 95% CI 1.14–5.91, $p = 0.037$), adjusted for age, gender, creatinine clearance, ACR, smoking status, the presence of hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia levels, HTN and central obesity.

Other significant findings of this study was that ACR was positively associated with HTN duration ($r = +0.266$, $p = 0.026$) and HbA1c levels ($r = +0.310$, $p = 0.011$), but not with nephrin, podocin or synaptopodin mRNA levels in urine (p = NS, for all). Both serum creatinine and urea levels were significantly correlated with DM ($r = +0.315$, $p = 0.008$ and $r = +0.235$, $p = 0.05$, respectively) and HTN duration ($r = +0.350$, $p = 0.003$ and $r = +0.333$, $p = 0.005$, respectively). Urea levels were also associated with age ($r = +0.242$, $p = 0.0111$), while eGFR was negatively related with DM and HTN duration ($r = -0.222$, $p = 0.058$ and $r = -0.393$, $p = 0.001$, respectively).

Discussion

Podocyte injury plays a fundamental role in the development of glomerular disease [23–25]. Structural alterations with downregulation of podocyte function-specific proteins as well as podocytopenia occur in DN [26–31]. The detection of podocytes or associated markers in urine as an index of podocyte damage has been described in glomerulopathies including DN, pre-eclampsia and other diseases [18, 19, 32–36].

In the present study, we examined the urinary excretion of podocyte-specific markers in patients with type 2 DM and normal UAE. To our knowledge, this is the largest normoalbuminuric diabetic population that has been studied with regards to the presence of podocyte-specific markers in urine.

Of note, synaptopodin mRNA was uniformly detected in all the subjects independent of their DM status. Synap-

Table 1. Comparisons between diabetic and control groups

a

	Diabetics (n = 71)	Controls (n = 39)	Total (n = 110)	p value
Male gender	27 (38)	11 (28.2)	38 (34.5)	0.300
Current smokers	9 (12.5)	11 (28.2)	20 (18.2)	0.030
HTN	44 (62.0)	15 (38.5)	59 (53.7)	0.018
Hypercholesterolemia	52 (76.5)	16 (41)	68 (61.8)	0.001
Hypertriglyceridemia	40 (56.3)	9 (23)	49 (44.5)	0.001
Central obesity	57 (80.3)	20 (51.3)	77 (70)	0.001
CAD	9 (12.7)	3 (7.7)	12 (10.9)	0.423
PAD	0	1 (2.6)	1 (0.9)	0.176
Retinopathy	6 (8.5)	0	6 (5.5)	0.062
Urinary nephrin and/or podocin mRNA	38 (53.5)	12 (30.8)	50 (45.58)	0.022
CVA/carotid disease	2 (2.8)	1 (2.5)	3 (2.7)	0.398
Medication use				
ACEI	17 (23.9)	1 (2.6)	18 (16.4)	0.004
ARBs	27 (38)	6 (15.4)	33 (30)	0.013
Diuretics	17 (23.9)	4 (10.2)	21 (19.1)	0.081
CCBs	12 (16.8)	0	12 (10.9)	0.007
Statins	46 (64.8)	0	46 (41.8)	<0.001

Data are expresses as number (%).

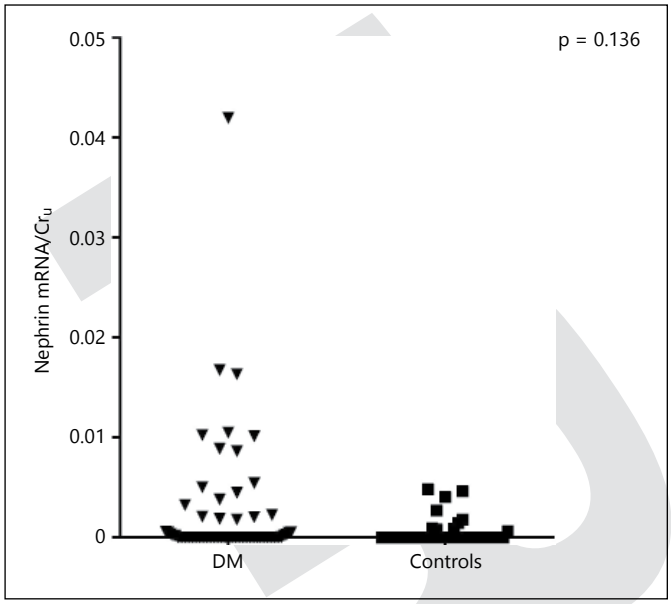
CAD = Coronary artery disease; PAD = peripheral arterial disease; ARB = angiotensin receptor blocker; ACEI = angiotensin-converting enzyme inhibitor; CCB = calcium channel blocker; CVA = ■■■.

b

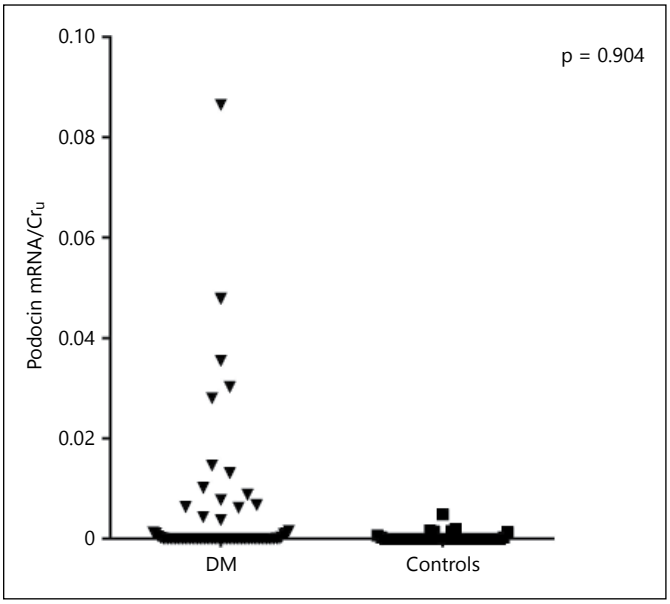
	Diabetics (n = 71)	Controls (n = 39)	Total (n = 110)	p value
Age, years	64.6 (1.1)	62.3 (1.7)	63.8 (0.943)	0.147
Waist circumference, cm	102.9 (1.47)	95.6 (1.91)	100.3 (1.21)	*0.005*
Systolic blood pressure, mm Hg	125.4 (1.76)	125.2 (2.6)	125.3 (1.46)	0.957
Diastolic blood pressure, mm Hg	73.4 (1.1)	73.3 (1.47)	73.7 (0.77)	0.992
HTN duration, years	6.6 (1.01)	5.9 (1.25)	6.5 (0.83)	0.527
Glucose, mg/dl*	149.7 (5)	94 (2.01)	133.3 (4.61)	*<0.001*
Creatinine, mg/dl	0.9 (0.020)	1.1 (0.21)	0.97 (0.075)	0.112
Urea, mg/dl	37.7 (1.19)	39.2 (1.63)	38.2 (0.96)	0.458
eGFR	78.5 (1.74)	75.4 (2.13)	77.5 (1.39)	0.286
Total cholesterol, mg/dl	166.7 (3.91)	195.8 (7.78)	174.4 (3.78)	*0.008*
Low-density lipoprotein cholesterol, mg/dl	92.9 (2.94)	114.7 (5.54)	98.6 (2.78)	*0.006*
High-density lipoprotein cholesterol, mg/dl	44.1 (1.42)	50.3 (6.5)	45.7 (1.31)	*0.037*
Triglycerides, mg/dl	157.9 (10.7)	149.4 (20.7)	155.7 (9.49)	0.844
ACR, mg/g	8.3 (0.63)	9.9 (1.0)	8.86 (0.54)	0.147

Data are expressed as mean (SEM).

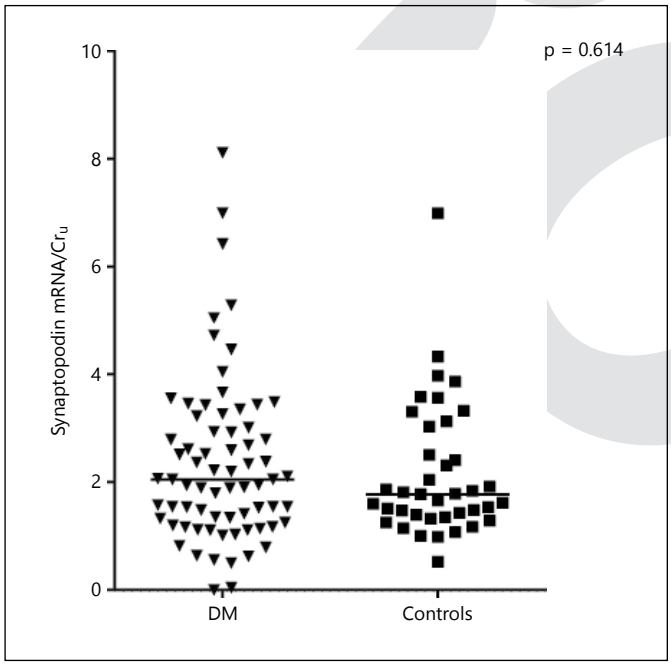
topodin is primarily expressed in podocyte foot processes as a cytoskeleton protein [36]. The detection of synaptopodin mRNA in the urine of all subjects appears reasonable considering the physiological role of synaptopodin as an actin-associated protein and the high intraglomerular hydrostatic pressure confronted by podocyte cytoskeleton. Although numerous proteins including nephrin are associated with actin, synaptopodin is one of the most important proteins of cytoskeleton and the most closely physically linked to it among the ones examined in the



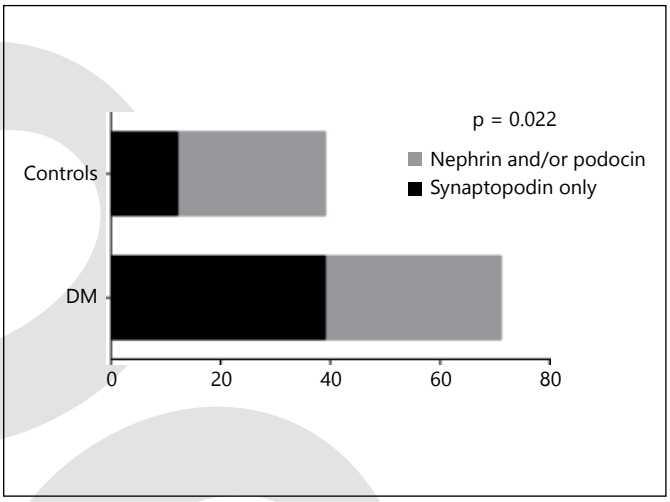
1



2



3



4

Fig. 1. Nephrin mRNA in patients with DM and controls.
Fig. 2. Podocin mRNA in patients with DM and controls.
Fig. 3. Synaptopodin mRNA in patients with DM and controls.
Fig. 4. Prevalence of nephrin and/or podocin mRNA in the urine of patients with DM and controls.

present study. This finding renders synaptopodin rather unsuitable for the diagnosis of podocyte injury. This is further supported by findings of other studies thereby suggesting a positive correlation between urinary synaptopodin mRNA levels and the number of podocytes in the glomeruli [37]. The underlying physiology is not clear yet. Consistently, podocalyxin has been found in the urine on membrane vesicles originating from podocytes microvilli of both controls and diabetics, which may reflect a normal turnover of podocytic material [38]. Of particular interest is that synaptopodin mRNA excretion was positively related with eGFR but inversely associated with nephrin and podocin, while the latter 2 components are strongly inter-related. This further favors the hypothesis that synaptopodin mRNA excretion could be part of the podocyte physiology, while the presence of nephrin or podocin may be the result of podocyte damage.

Diabetic patients differed from non-diabetic controls with regard to the urinary excretion of nephrin and/or podocin mRNA. The simultaneous identification of 2 or

Table 2. Comparisons between nephrin and/or podocin and synaptopodin-only groups

a

	Nephrin and/or podocin group (n = 50)	Synaptopodin-only group (n = 60)	Total (n = 110)	p value
Male gender	15 (30)	23 (38.3)	38 (34.5)	0.360
Smoking	10 (20)	10 (16.7)	20 (18.2)	0.800
DM	38 (76)	33 (55)	71 (64.5)	0.022
HTN	30 (60)	29 (48.3)	59 (53.6)	0.222
Hypercholesterolemia	33 (66)	35 (58.3)	68 (61.8)	0.274
Hypertriglyceridemia	23 (46)	26 (43.3)	49 (44.5)	0.779
Central obesity	37 (74.0)	40 (66.7)	77 (70)	0.403
CAD	5 (10)	7 (11.7)	12 (10.8)	0.780
PAD	0	1 (1.7)	1 (0.9)	0.359
Retinopathy	5 (10)	1 (12.7)	6 (5.5)	0.055
CVA/carotid disease	2 (3.3)	1 (2.0)	3 (2.7)	0.293
Medication use				
ACEI	8 (16)	10 (16.7)	18 (16.4)	0.925
ARBs	20 (40)	13 (21.7)	33 (10)	0.037
Diuretics	12 (24)	9 (15)	21 (19.1)	0.232
Statins	25 (50)	21 (35)	46 (41.8)	0.112

Data are expresses as number (%).

CAD = Coronary artery disease; PAD = peripheral arterial disease; ARB = angiotensin receptor blocker; ACEI = angiotensin-converting enzyme inhibitor; CCB = calcium channel blocker; CVA = ■■■.

b

	Nephrin and/or podocin group (n = 50)	Synaptopodin-only group (n = 60)	Total (n = 110)	p value
Age, years	65.1 (1.29)	62.6 (1.22)	63.7 (0.94)	0.184
Waist circumference, cm	98.9 (1.38)	101.5 (1.68)	100.3 (1.21)	0.281
Systolic blood pressure, mm Hg	126.8 (2.53)	124 (1.66)	125.3 (1.47)	0.374
Diastolic blood pressure, mm Hg	73.4 (1.52)	73.3 (0.94)	73.4 (0.85)	0.943
HTN duration, years	6.4 (1.07)	6.5 (1.30)	6.5 (0.83)	0.946
Glucose, mg/dl	130.9 (5.14)	135.4 (7.7)	133.3 (4.61)	0.611
HbA1c, %	7.76 (0.28)	7.11 (0.18)	7.42 (1.71)	0.056
DM duration	8.5 (0.94)	11.1 (1.21)	9.7 (0.77)	0.093
Creatinine, mg/dl	0.88 (0.021)	1.05 (0.14)	0.97 (0.064)	0.254
Urea, mg/dl	36.9 (1.55)	39.3 (1.19)	38 (0.91)	0.206
eGFR, ml/min/1.73 m^2	77.6 (1.92)	77.3 (2.01)	77.5 (1.39)	0.920
Total cholesterol, mg/dl	169.4 (5.56)	179.3 (5.07)	174.4 (3.77)	0.190
Low-density lipoprotein cholesterol, mg/dl	96.7 (4.27)	100.5 (3.62)	98.2 (2.7)	0.488
High-density lipoprotein cholesterol, mg/dl	46.4 (1.73)	45.2 (1.97)	45.7 (1.31)	0.652
Triglycerides, mg/dl	135.5 (10.31)	175.3 (15.4)	155.7 (9.49)	0.036
ACR, mg/g	9.5 (0.77)	8.09 (0.74)	8.9 (0.54)	0.198

Data are expressed as mean (SEM).

3 specific podocytic markers in the urine, with a highly sensitive method, might strongly indicate increased urinary excretion of podocytic material (whole podocytes, cellular fragments, vesicles and/or exosomes). The presence of nephrin and/or podocin mRNA in the urine was significantly more prevalent among diabetics than among non-diabetics, even when analysis was restricted to normoalbuminuric individuals. Furthermore, according to the regression analysis, we indicated that the presence of nephrin and/or podocin mRNA in the urine was signifi-

PROOF

cantly associated only with the DM, suggesting that none of the above-mentioned baseline characteristic differences can account for the difference in urinary podocyte markers excretion. Indeed, the differences in the baseline clinical characteristics between diabetics and non-diabetics disappeared when the same comparison was applied between subjects with nephrin and/or podocin and those with synaptopodin only (table 2b). Moreover, none of other established cardiovascular factors, such as HTN, obesity, male sex, smoking, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and micro/macroalbuminuriam, were significantly associated with the presence of nephrin and/or podocin mRNA in the urine. The pathophysiology underlying the presence of nephrin and podocin mRNA in the urine of diabetics with normoalbuminuria is yet to be elucidated. We can speculate that hemodynamic stress under the conditions of hyperfiltration, which is known to characterize early DN, may partly contribute to the shedding of cellular material in the urine. It is likely that mechanisms believed to mediate podocyte injury, such as neurohormonal changes and oxidative stress [7, 8], make podocytes more vulnerable.

Furthermore, neither nephrin nor podocin nor synaptopodin urinary mRNA levels were correlated with ACR which is in accordance with current evidence [18, 19]. This finding is consistent with the results of previous smaller studies [11, 39, 40] and indicates that podocyte injury may be present in diabetics before the advent of microalbuminuria. Nonetheless, other studies have reported significant correlations of podocyte molecule expression in urine with a degree of proteinuria [20], though these data were derived from patients with established DN (mainly by biopsy) and confirmed micro/macroalbuminuria.

Our findings suggest markers of podocyte injury can be detected in patients with DM and normal UAE. As this is a cross-sectional analysis, whether these subjects will progress to DN is unknown. However, considering the established principal role of podocyte injury in the pathophysiology of diabetic kidney, this finding could represent an early sign of kidney damage by DM. We used a sensitive and accurate technique to estimate podocyte marker excretion. Even though real-time PCR is not preferably used in everyday clinical practice, it is a reliable and relatively simple to perform compared to other methods previously used in the detection of podocytes, such as immune staining or fluorescence-activated cell sorting. Furthermore, real-time PCR is far more accurate than the methods used to detect protein level such as ELISA. Interestingly, a recent study showed increased production and urinary excretion of podocyte microparticles in response to mechanical and glucose stress in animal models of DN prior to the development of microalbuminuria compared with their non-diabetic counterparts [41]. These findings are concordant with our results underlining the role of early diagnosis of podocyte injury. More importantly, these findings further support the diagnostic accuracy of our method to detect podocyte injury; it appears that podocyte insult can be expressed as the excretion of podocyte-associated molecules (e.g., microparticles and debris) and not necessarily whole cell shedding. Thus, methods based on cell detection such as fluorescence-activated cell sorting or immunofluorescence may be inferior in terms of sensitivity of detecting podocyte injury.

Regarding previous studies, increased urinary mRNA levels of nephrin, podocin and synaptopodin have been reported in patients with biopsy-proven diabetic glomerulosclerosis [20, 41]. However, this was not the case when patients with diabetic microalbuminuria (without histological data) were compared with controls [42]. Consistent with our findings, a strong internal correlation between nephrin and podocin urinary mRNA has been suggested [2], indicating a common pathophysiologic pathway for their presence in the urine. In another study, urinary mRNA levels of 5 podocyte markers were found to be higher in patients with DN compared with those of controls [17]. The median value of these markers in the normoalbuminuric subgroup did not appear significantly different from that of controls. Moreover, the urinary mRNA levels of nephrin, podocalyxin, transient receptor potential calcium channel 6, podocin, synaptopodin and alpha-actinin-4 were increased among diabetic patients with different degrees of albuminuria compared with non-diabetic subjects [41]. When subjects with prediabetes were compared with controls, no significant difference was noticed. Normoalbuminuric diabetics had increased mRNA levels of nephrin, podocalyxin, transient receptor potential calcium channel 6 and alpha-actinin-4, but not podocin and synaptopodin [41]. In concordance to our findings, increased nephrin mRNA levels in urine was found in 53% of those with normoalbuminuric diabetics.

ELISA has also been employed to detect nephrin in urine [11]. Increased urinary nephrin levels were found in 100% of diabetic patients with micro and macroalbuminuria, 54% of those with normoalbuminuria and none of the controls. Urinary podocalyxin has also been measured in patients with DM and other glomerular diseases [42]. Patients with DM had significantly greater podocalyxin levels in urine compared with controls, independent

of their UAE status. Urinary podocalyxin was increased in 53.8% of diabetic patients with normoalbuminuria, 64.7% of those with microalbuminuria and 66.7% with macroalbuminuria [37]. Podocyturia has been detected by the use of immunofluorscence in diabetic patients with increased UAE [18]. The number of urinary podocytes did not correlate with the degree of albuminuria or glycemic control and duration of DM. In another study, the urinary nephrin levels assessed by Western blot were associated with a decline in eGFR among normoalbuminuric patients with DM [43], and similar results were obtained for total study population which unfortunately did not include a non-diabetic control group.

Most of previous studies had some limitations such as the low power estimates and small populations [17–20, 41]. The only study which involved a larger population examined only one podocyte marker and did not include a control group [44]. In addition, the study population in some cases was rather heterogeneous involving subjects with different glomerular pathologies [35, 45]. Moreover, studies so far have focused on patients with established DN, either by biopsy or by the presence of micro/macroalbuminuria, whereas limited data exist regarding normoalbuminuric diabetic patients.

Overall, this study, including the largest population studied so far, demonstrated the presence of podocyte markers in the urine of normoalbuminuric diabetic patients and that DM is actually the only significant determinant of early podocyte injury. It appears of particular importance to prospectively evaluate diabetic patients with urinary nephrin and/or podocin mRNA and normal UAE to clarify whether they are at increased risk of developing DN, the relation to prognosis and if early treatment, for example, with angiotensin-converting enzyme inhibitors may retard the development of renal injury.

Conclusions

DM appears as the only significant determinant of podocyte injury in our study. Markers of podocyte injury are present in the urine of patients with DM prior to the development of micro or macroalbuminuria, while ageing is also an important contributing factor. Given the occasional presence of these markers also in non-diabetic individuals, a quantitative threshold should be standardized and preferably used to define pathologic amounts of mRNA in urine. The correlation of these mRNA levels in urine with histological data and prospective albumin and renal function measurements may provide useful information regarding acceptable diagnostic threshold.

Kidney biopsy remains an irreplaceable diagnostic tool in clinical nephrology [46]. However, as an invasive procedure with its innate risks, it is saved for particular indications and can under no circumstances be used as a screening tool.

On the contrary, the standardization and establishment of a sensitive measurement of podocyte markers in the urine may become a diagnostic tool to detect early renal damage. Further research is required, and large prospective studies are warranted. Should this speculation be confirmed, the role of nephroprotective medication will then need to be assessed.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

None.

References

1 Collins AJ, Foley RN, Chavers B, Gilbertson D, Herzog C, Johansen K, Kasiske B, Kutner N, Liu J, St Peter W, Guo H, Gustafson S, Heubner B, Lamb K, Li S, Li S, Peng Y, Qiu Y, Roberts T, Skeans M, Snyder J, Solid C, Thompson B, Wang C, Weinhandl E, Zaun D, Arko C, Chen SC, Daniels F, Ebben J, Frazier E, Hanzlik C, Johnson R, Sheets D, Wang X, Forrest B, Constantini E, Everson S, Eggers P, Agodoa L: United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease & end-stage renal disease in the United States. Am J Kidney Dis 2012;59(1 suppl 1):A7. e1–e420.

2 Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar AP, Thomazelli FC, Matos JD, Canani LH: Diabetic nephropathy. Diabetol Metab Syndr 2009;1:10.

3 KDOQI: KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease. Am J Kidney Dis 2007;49(2 suppl 2):S12–S154.

4 Standards of medical care in diabetes – 2015. Diabetes Care 2015;38(suppl):S1–S2.

5 de Boer IH, Rue TC, Hall YN, Heagerty PJ, Weiss NS, Himmelfarb J: Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. JAMA 2011;305:2532–2539.

6 Shankland SJ: The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. Kidney Int 2006;69:2131–2147.

7 Stitt-Cavanagh E, MacLeod L, Kennedy C: The podocyte in diabetic kidney disease. ScientificWorldJournal 2009;9:1127–1139.

8 Ziyadeh FN, Wolf G: Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. Curr Diabetes Rev 2008;4: 39–45.

9 Chen HC, Chen CA, Guh JY, Chang JM, Shin SJ, Lai YH: Altering expression of alpha3beta1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes. Life Sci 2000;67:2345–2353.

10 Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH: Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. Kidney Int 2008;74:22–36.
11 Jim B, Ghanta M, Qipo A, Fan Y, Chuang PY, Cohen HW, Abadi M, Thomas DB, He JC: Dysregulated nephrin in diabetic nephropathy of type 2 diabetes: a cross sectional study. PLoS One 2012;7:e36041.
12 Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP: Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. Diabetes 2006;55:225–233.
13 Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW: Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. J Clin Invest 1997;99:342–348.
14 Toyoda M, Najafian B, Kim Y, Caramori ML, Mauer M: Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration in human type 1 diabetic nephropathy. Diabetes 2007;56:2155–2160.
15 Nakamura T, Kawagoe Y, Koide H: Effect of cigarette smoking on urinary podocyte excretion in early diabetic nephropathy. Diabetes Care 2003;26:1324–1325.
16 Nakamura T, Ushiyama C, Osada S, Hara M, Shimada N, Koide H: Pioglitazone reduces urinary podocyte excretion in type 2 diabetes patients with microalbuminuria. Metabolism 2001;50:1193–1196.
17 Nakamura T, Ushiyama C, Shimada N, Sekizuka K, Ebihara I, Hara M, Koide H: Effect of the antiplatelet drug dilazep dihydrochloride on urinary podocytes in patients in the early stage of diabetic nephropathy. Diabetes Care 2000;23:1168–1171.
18 Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H: Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2000; 15:1379–1383.
19 Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Kwan BC, Li PK, Szeto CC: Urinary messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in patients with diabetic nephropathy treated by angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker. Eur J Endocrinol 2008;158:317–322.
20 Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Li KT, Szeto CC: Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. Nephron Clin Pract 2007;106:c169–c179.
21 Zheng M, Lv LL, Ni J, Ni HF, Li Q, Ma KL, Liu BC: Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. PLoS One 2011;6:e20431.
22 Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration): A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med 2009;150:604–612.
23 Griffin SV, Petermann AT, Durvasula RV, Shankland SJ: Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. Nephrol Dial Transplant 2003;18(suppl 6):vi8–vi13.
24 Kriz W, Lemley KV: The role of the podocyte in glomerulosclerosis. Curr Opin Nephrol Hypertens 1999;8:489–497.
25 Phillips A, Janssen U, Floege J: Progression of diabetic nephropathy. Insights from cell culture studies and animal models. Kidney Blood Press Res 1999;22:81–97.
26 Baelde HJ, Eikmans M, Lappin DW, Doran PP, Hohenadel D, Brinkkoetter PT, van der Woude FJ, Waldherr R, Rabelink TJ, de Heer E, Bruijn JA: Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss. Kidney Int 2007;71:637–645.
27 Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z: Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. Diabetologia 2001;44:874–877.
28 Doublier S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, Deferrari G, Camussi G: Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. Diabetes 2003;52:1023–1030.
29 Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Thomson NM, Holthöfer H, Zaoui P, Pinel N, Cordonnier DJ, Gilbert RE: Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. Diabetologia 2002;45:1572–1576.
30 Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG: Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with type II diabetes and microalbuminuria. Diabetologia 1999;42:1341–1344.
31 Turk T, Leeuwis JW, Gray J, Torti SV, Lyons KM, Nguyen TQ, Goldschmeding R: BMP signaling and podocyte markers are decreased in human diabetic nephropathy in association with CTGF overexpression. J Histochem Cytochem 2009;57:623–631.
32 Craici IM, Wagner SJ, Bailey KR, Fitz-Gibbon PD, Wood-Wentz CM, Turner ST, Hayman SR, White WM, Brost BC, Rose CH, Grande JP, Garovic VD: Podocyturia predates proteinuria and clinical features of preeclampsia: longitudinal prospective study. Hypertension 2013;61:1289–1296.
33 Kelder TP, Penning ME, Uh HW, Cohen D, Bloemenkamp KW, Bruijn JA, Scherjon SA, Baelde HJ: Quantitative polymerase chain reaction-based analysis of podocyturia is a feasible diagnostic tool in preeclampsia. Hypertension 2012;60:1538–1544.
34 Sabino AR, Teixeira Vde P, Nishida SK, Sass N, Mansur JB, Kirsztajn GM: Detection of podocyturia in patients with lupus nephritis. J Bras Nefrol 2013;35:252–258.
35 Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, Yang Y, Wang F, Chowdhury M, Graham D, Hawkins J, Nishizono R, Tanzer M, Wiggins J, Escobar GA, Rovin B, Song P, Gipson D, Kershaw D, Wiggins RC: Urine podocyte mRNAs, proteinuria, and progression in human glomerular diseases. J Am Soc Nephrol 2013;24:2081–2095.
36 Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J: Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. J Am Soc Nephrol 2005;16:1733–1741.
37 Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Kwan BC, Li KT, Szeto CC: Intra-renal and urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules for the estimation of glomerular podocyte loss. Ren Fail 2010;32:372–379.
38 Mundel P, Schwarz K, Reiser J: Podocyte biology: a footstep further. Adv Nephrol Necker Hosp 2001;31:235–241.
39 Hara M, Yanagihara T, Hirayama Y, Ogasawara S, Kurosawa H, Sekine S, Kihara I: Podocyte membrane vesicles in urine originate from tip vesiculation of podocyte microvilli. Hum Pathol 2010;41:1265–1275.
40 Mundel P: [Synaptopodin: an actin-associated protein of telencephalic dendrites and of podocytes in the kidney glomerulus]. Ann Anat 1998;180:391–392.
41 do Nascimento JF, Canani LH, Gerchman F, Rodrigues PG, Joelsons G, dos Santos M, Pereira S, Veronese FV: Messenger RNA levels of podocyte-associated proteins in subjects with different degrees of glucose tolerance with or without nephropathy. BMC Nephrol 2013;14:214.
42 Hara M, Yamagata K, Tomino Y, Saito A, Hirayama Y, Ogasawara S, Kurosawa H, Sekine S, Yan K: Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin. Diabetologia 2012;55:2913–2919.
43 Burger D, Thibodeau JF, Holterman CE, Burns KD, Touyz RM, Kennedy CR: Urinary podocyte microparticles identify prealbuminuric diabetic glomerular injury. J Am Soc Nephrol 2014;25:1401–1407.
44 Ng DP, Tai BC, Tan E, Leong H, Nurbaya S, Lim XL, Chia KS, Wong CS, Lim WY, Holthöfer H: Nephrinuria associates with multiple renal traits in type 2 diabetes. Nephrol Dial Transplant 2010;26:2508–2514.
45 Szeto CC, Lai KB, Chow KM, Szeto CY, Yip TW, Woo KS, Li PK, Lai FM: Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. Clin Chim Acta 2005;361:182–190.
46 Glassock RJ: Con: Kidney biopsy: an irreplaceable tool for patient management in nephrology. Nephrol Dial Transplant 2015;30: 528–531.