



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors) και
Χρόνια Νεφρική Νόσος**

ΞΑΝΘΗ ΖΗΚΟΥ

Νεφρολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors) και
Χρόνια Νεφρική Νόσος**

ΞΑΝΘΗ ΖΗΚΟΥ

Νεφρολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

Η έγκριση της διακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομικού κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης της κ. Ζήκου Ξανθής: 24-2-2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 658^α/7-4-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας -Νεφρολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Βούλγαρη Παρασκευή Επίκουρη Καθηγήτρια Ρευματολογίας με έμφαση στην Ανοσολογία του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κατωπόδης Κωνσταντίνος Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 19-5-2009

«Υποδοχείς τύπου Toll (Toll -like receptors) και χρόνια νεφρική νόσος»

Ανασυγκρότηση της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 697^α/7-12-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας -Νεφρολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Βούλγαρη Παρασκευή Επίκουρη Καθηγήτρια Ρευματολογίας με έμφαση στην Ανοσολογία του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσελέπης Αλέξανδρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 780^α/2-7-2015

Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος	Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας -Νεφρολογίας του Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσελέπης Αλέξανδρος	Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βούλγαρη Παρασκευή	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ρευματολογίας με έμφαση στην Ανοσολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπαϊρακτάρη Ελένη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τατσιώνη Αθηνά

Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Ιατρικής του Τμήματος
Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τίγκας Στυλιανός

Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας του Τμήματος
Ιατρικής
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ντουνούση Ευαγγελία

Λέκτορας Νεφρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΆΡΙΣΤΑ» στις 23-9-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

...στους γονείς μου

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα εξωτερικά Ιατρεία Χρόνιας Νεφρικής Νόσου του Νεφρολογικού τμήματος του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, σε συνεργασία με το Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών του τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το διάστημα 2008-2012.

Την επίβλεψη της διατριβής είχε ο Καθηγητής Παθολογίας/ Νεφρολογίας Κωνσταντίνος Σιαμόπουλος. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση της παρούσας διατριβής. Η καθοδήγησή του και οι ανεκτίμητες επιστημονικές του συμβουλές ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις ηθικές αξίες και τις πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσής μου στην ειδικότητα της Νεφρολογίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή του τμήματος Χημείας και μέλος της τριμελούς επιτροπής, κ Αλέξανδρο Τσελέπη για την καθοδήγησή του και τις ανεκτίμητες επιστημονικές συμβουλές σε θέματα βασικής έρευνας και την ουσιαστική συμβολή του στην αξιολόγηση των δεδομένων. Η συμβολή του και η βοήθεια του ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ρευματολογίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής Σταυρούλα Βούλγαρη, για τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές και τις ιδιαίτερες χρήσιμες πληροφορίες της. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη Λέκτορα Νεφρολογίας και φίλη Ευαγγελία Ντουνούση για το ειλικρινές ενδιαφέρον και την ηθική υποστήριξη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου, καθώς επίσης και την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση στην επεξεργασία των δεδομένων της διατριβής μου.

Ευχαριστώ πολύ τη βιοχημικό Κλεοπάτρα Ρουσούλη και το βιοχημικό Κώστα Τέλη για την άπογη συνεργασία κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των δειγμάτων καθώς και τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν για τη λειτουργία του ερευνητικού χώρου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αμέριστη αγάπη, την κατανόηση και την συμπαράστασή τους.

Πίνακας περιεχομένων

	Σελίδα
Συντμήσεις	
Γενικό μέρος	1
Κεφάλαιο 1 Θεμελιώδη στοιχεία της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου (XNN)	1
1.1. Εισαγωγή	1
1.2. Ορισμός- Στάδια και επιδημιολογία της XNN	2
1.3. Επιδημιολογία της XNN	5
Κεφάλαιο 2 Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ)	7
2.1. Εισαγωγή	7
2.2. Επιδημιολογία της ΔΝ	8
2.3. Παθογένεια της ΔΝ	9
Κεφάλαιο 3 Ο ρόλος της φλεγμονής στη XNN και στη ΔΝ	15
3.1. Φλεγμονή και XNN	15
3.2. Ο ρόλος των κυτοκινών στη XNN	15
3.3. Ο ρόλος της φλεγμονής στη ΔΝ	19
3.4. Αυξητικοί παράγοντες και ο ρόλος τους στη νεφρική ίνωση	22
Κεφάλαιο 4 Υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like Receptors, TLRs)	25
4.1. Εισαγωγή	25
4.2. Εισαγωγικά στοιχεία στο ανοσιακό σύστημα	25
4.3. Δομή και εξωγενείς συνδέτες (ligands) των TLRs	27
4.4. Ενδογενείς συνδέτες για τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς TLRs	32
4.5. Σηματοδότηση μέσω του TLR (TLR signaling)	32
Κεφάλαιο 5 Δυνητικοί ρόλοι TLRs στις νεφρικές νόσους	35
5.1. Ρόλος των TLRs στις Νεφρικές Νόσους	35
5.2. TLRs και λοιμώξεις	36
5.3. TLRs και οξεία νεφρική ανεπάρκεια	37
5.4. TLRs και σπειραματονεφρίτιδες	38
5.5. TLRs και απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος	39
5.6. TLRs και νεφρική βλάβη εξ' ισχαιμίας και επαναιμάτωσης	40
5.7. TLRs και ΧΝΝΤΣ	41
Σκοπός της μελέτης	43
Ειδικό μέρος	45
Κεφάλαιο 6 Ασθενείς και μέθοδοι	45
6.1. Χαρακτηριστικά ασθενών	45
6.2. Μέθοδοι	46
6.2.1. Προσδιορισμός μεμβρανικής έκφρασης των TLR2 και TLR4 σε μη διεγερμένα και σε διεγερμένα με Pam3CSK4 μονοκύτταρα ολικού αίματος μέσω κυτταρομετρία ροής	46
6.2.2. Προσδιορισμός των επιπέδων των ενδοκυττάρων κυτοκινών IL-6 και IL-1β σε μονοκύτταρα ολικού αίματος πριν και μετά την ενεργοποίηση με τον Pam3CSK4 μέσω κυτταρομετρία ροής	49

6.2.3.	Προσδιορισμός φλεγμονωδών πρωτεϊνών στον ορό	51
6.3.	Στατιστική ανάλυση	55
Κεφάλαιο 7	Αποτελέσματα	57
7.1.	Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης	57
7.2.	Μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 στα μονοκύτταρα	58
7.2.1.	Συσχετίσεις των μεμβρανικών υποδοχέων TLR2 και TLR4	60
7.3.	Επίπεδα των ενδοκυττάρων κυτοκινών IL-6 και IL-1β σε μονοκύτταρα πριν και μετά την ενεργοποίηση με τον συνδέτη Pam3CSK4	63
7.4.	Προσδιορισμός κυτοκινών στον ορό	66
7.4.1.	Συσχετίσεις των φλεγμονωδών πρωτεϊνών	69
Κεφάλαιο 8	Συζήτηση	71
8.1.	Μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 και ενδοκυττάρια σύνθεση κυτοκινών	71
8.2.	Προσδιορισμός των κυτοκινών στον ορό	75
	Συμπεράσματα	79
	Περίληψη	81
	Summary	85
	Βιβλιογραφία	89

Συντμήσεις- Επεξηγήσεις

XNN	Χρόνια Νεφρική Νόσος
XNATΣ	Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια τελικού σταδίου
ΔΝ	Διαβητική Νεφροπάθεια
ΣΔ	Σακχαρώδης Διαβήτης
eGFR	Estimated glomerular filtration rate
PCR	protein/ creatinine ratio
ACR	Albumin/ creatinine ratio
VEGF	Vascular endothelial growth factor
TGF-β	Transforming growth factor β
RAAS	Σύστημα Ρενίνης Αγγειοτενσίνης Αλδοστερόνης
AGEs	Advanced glycosylation end products
PCK	Protein kinase C
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor
ACE	Angiotensin converting enzyme
APCs	Antigen presenting cells
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
TNF-α	tumor necrosis factor-α
LPS	Lipopolisaccharide
IL-1RA	Interleukin-1 receptor antagonist
INF-γ	Ιντερφερόνη γ
NF-κβ	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
PDGF	Platelet derived growth factor
TLRs	Toll-like receptors
PAMPS	Pathogen-associated molecular patterns
DAMPs	Danger-associated molecular pattern molecules
PRRs	Pattern recognition receptors
IRF	Interferon regulatory factor
AP-1	Activator protein-1
TIR	Toll/IL-1 receptor περιοχή
LBP	LPS-binding protein
Hsp	Heat shock protein
HMGB-1	High mobility group protein B-1
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
IRAK	IL-1 receptor-associated kinases
TAK1	Transforming growth factor-b-activated kinase -1
TAB	TAK-binding proteins
Pam3CSK4	Συνθετικός συνδέτης του TLR2
ΣΕΛ	Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος
HCV	Ηπατίτιδα C
CCL5	cc ligand 5 chemokine

BFA	Brefeldin A
HDL-C	High density lipoprotein cholesterol
LDL-C	Low density lipoprotein cholesterol
HbA1c	Glycosylated hemoglobin
hsCRP	C-reactive protein high sensitivity
MFI	Mean fluorescence intensity
MIP-1a	Macrophage inflammatory protein-1 ^α
IP-10	Induced protein-10
FGF	Fibroblast growth factors
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
PDGF	Platelet-derived growth factor

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Θεμελιώδη στοιχεία της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου (XNN)

1.1. Εισαγωγή

Η ΧNN είναι μια ετερογενής ομάδα διαταραχών που χαρακτηρίζεται από διαταραχές της νεφρικής δομής και λειτουργίας η οποία εκδηλώνεται με διάφορους τρόπους που εξαρτώνται από την υποκείμενη αιτία ή αιτίες καθώς και από τη σοβαρότητα της ασθένειας [1-4]. Αποτελεί μεγάλο επιδημιολογικό πρόβλημα σε όλο τον κόσμο [1]. Υπολογίζεται ότι πάνω από το 10% του πληθυσμού έχει προσβληθεί από αυτή τη νοσολογική οντότητα η οποία αποτελεί όχι μόνο ένα σοβαρό ιατρικό αλλά και ένα σημαντικό κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ) ο επιπολασμός της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου (XNATΣ) συνεχώς αυξάνεται [1]. Ο αριθμός των ασθενών που εγράφησαν σε πρόγραμμα ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης που χρηματοδοτεί την XNATΣ έχει αυξηθεί από περίπου 10,000 δικαιούχους το 1973 σε 615,899 το 2011 [5,6]. Αν και τα ακριβή αίτια δεν είναι γνωστά, οι δημογραφικές αλλαγές του πληθυσμού, ο δυτικός τρόπος ζωής με την αύξηση της επίπτωσης του διαβήτη, της υπέρτασης και της παχυσαρκίας, η μη έγκαιρη αναγνώριση της ΧΝΑ στα αρχικά στάδια της καθώς επίσης και των παραγόντων κινδύνου της, μπορεί να εξηγήσουν μερικώς αυτό το φαινόμενο [1,7-9]. Ασθενείς με XNATΣ καταναλώνουν ένα δυσανάλογο μερίδιο των πόρων υγειονομικής περίθαλψης. Το συνολικό κόστος των προγραμμάτων XNATΣ στις ΗΠΑ ήταν περίπου 43,9 δις \$ το 2011. Ενδεικτικά να αναφέρουμε ότι το κόστος ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης ανά ασθενή ανά έτος κυμαίνεται από 32,922\$ για τους μεταμοσχευμένους σε 87,945\$ για τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς [5,6]. Ωστόσο, παρόλο το μέγεθος των πόρων που δεσμεύονται για τη θεραπεία της XNATΣ και τις ουσιαστικές βελτιώσεις στην +παρεχόμενη θεραπεία αιμοκάθαρσης, οι ασθενείς αυτοί συνεχίζουν να βιώνουν σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα καθώς και μειωμένη ποιότητα ζωής.

Τα τελευταία χρόνια έγινε σαφές ότι η εξέλιξη της ΧNN σε νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου είναι δυνατό να προληφθεί και να επιβραδυνθεί. Η θεραπευτική παρέμβαση στα πρώιμα στάδια της ΧNN μπορεί να συμβάλει στην πρόληψη, την επιβράδυνση και στη μείωση εμφάνισης των καρδιακών επιπλοκών, οι οποίες αποτελούν τις κύριες αιτίες θνητότητας στη νεφρική νόσο. Τα πρώιμα στάδια της νεφρικής νόσου, παρόλο που η διάγνωση μπορεί να γίνει με απλές εξετάσεις, χαρακτηρίζονται από έλλειψη συμπτωμάτων με αποτέλεσμα να υποδιαγιγνώσκονται και να υποθεραπεύονται. Για το λόγο αυτό προέκυψε η ανάγκη καθιέρωσης μιας γενικά αποδεκτής ταξινόμησης σταδίων της ΧNN και των μεθόδων μέτρησης της νεφρικής λειτουργίας.

1.2. Ορισμός- Στάδια και επιδημιολογία της ΧΝΝ

Το 2002 ο αμερικάνικος οργανισμός National Kidney Foundation δημοσίευσε οδηγίες κλινικής πρακτικής (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI)) και πρότεινε ένα απλό ορισμό και ταξινόμηση της ΧΝΝ βασισμένο στη σοβαρότητα της νόσου, το οποίο το 2004 υιοθετήθηκε με κάποιες τροποποιήσεις από τον οργανισμό Improving Global Outcomes (KDIGO) [1-4]. Αυτές οι κατευθυντήριες οδηγίες άλλαξαν την έννοια της νεφρικής νόσου από μια ασυνήθιστη και απειλητική για τη ζωή κατάσταση, διαχειρίσιμη μόνο από νεφρολόγους, σε μια κοινή παθολογική οντότητα με ένα ευρύ εύρος σοβαρότητας που αξίζει την προσοχή και άλλων ειδικοτήτων όπως οι παθολόγοι ή οι καρδιολόγοι και απαιτεί στρατηγικές για πρόληψη, έγκαιρη ανίχνευση και διαχείριση [4,10].

Σύμφωνα λοιπόν με τις κατευθυντήριες οδηγίες, η ΧΝΝ ορίζεται ως η παρουσία νεφρικής βλάβης ή έκπτωση νεφρικής λειτουργίας για τρεις ή και περισσότερους μήνες, ανεξαρτήτως από τη διάγνωση της πρωτοπαθούς νόσου [11]. Πιο αναλυτικά ένας λειτουργικός ορισμός της ΧΝΝ περιλαμβάνει τα παρακάτω κριτήρια (πίνακας 1).

Πίνακας 1.	Ορισμός της ΧΝΝ – Κριτήρια
1.	Νεφρική βλάβη για περισσότερο από 3 μήνες, όπως ορίζεται από λειτουργικές ή δομικές ανωμαλίες του νεφρού με ή χωρίς έκπτωση του GFR, πιστοποιημένη με: <ul style="list-style-type: none">• Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις, ή• Δείκτες νεφρικής βλάβης, (διαταραχές στον εργαστηριακό έλεγχο(αίμα και ούρα) και στον απεικονιστικό έλεγχο
2.	GFR < 60ml/min/1.73m ² για περισσότερο από 3 μήνες, με ή χωρίς νεφρική βλάβη

Η έκπτωση νεφρικής λειτουργίας αναφέρεται σε μειωμένο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (glomerular filtration rate, GFR). Αποτελεί τον καλύτερο δείκτη για τη διάγνωση και τη σταδιοποίηση της νεφρικής νόσου, ενώ ο φθίνων GFR είναι σήμα κατατεθέν της προοδευτικά επιδεινούμενης νεφρικής βλάβης [12]. Ο μετρούμενος GFR διαφοροποιείται στα φυσιολογικά άτομα ανάλογα με την ηλικία, το φύλο [13], την πρωτεϊνική πρόσληψη και πιθανά την φυλή, αν και το μέγεθος των φυλετικών μεταβολών δεν είναι καλά γνωστό. Σε φυσιολογικά νεαρά άτομα η φυσιολογική τιμή του GFR θεωρείται περίπου 125mL/min/1.73m². Με βάση μετρήσεων κάθαρσης σε φυσιολογικά άτομα και άτομα με νεφρική νόσο, η ευρέως αποδεκτή ουδός, οριζόμενη ως μειωμένη GFR, είναι μικρότερη από 60mL/min/1.73m², ενώ νεφρική ανεπάρκεια ορίζεται ως GFR < 15 mL/min/1.73m² ή θεραπεία με εξωνεφρική κάθαρση. Έτσι λοιπόν στην κλινική πράξη ασθενείς με GFR < 60mL/min/1.73m² θεωρείται ότι πάσχουν από ΧΝΝ και παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο θνητότητας από όλες τις αιτίες και από καρδιαγγειακά συμβάματα καθώς και μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης οξείας νεφρικής ανεπάρκειας και ΧΝΑΤΣ [11,14-18].

Η GFR μπορεί να υπολογιστεί απευθείας μέσω της κάθαρσης εξωγενών δεικτών (marker) διήθησης, όπως η ινουλίνη ή το iothalamate [19]. Παρόλα αυτά, οι μέθοδοι

αυτοί είναι περίπλοκοι και στην κλινική πράξη συνήθως χρησιμοποιείται ο εκτιμώμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης (eGFR), που υπολογίζεται μέσω εξισώσεων που χρησιμοποιούν την κρεατινίνη του ορού (ενδογενής δείκτης σπειραματικής διήθησης), και παραμέτρους όπως: ηλικία, φύλο, φυλή και επιφάνεια σώματος. Οι εξισώσεις αυτές παρέχουν μια πιο αξιόπιστη εκτίμηση του GFR σε σχέση με την κρεατινίνη ορού. Υπάρχουν διάφοροι τύποι υπολογισμού του GFR. Αναφέρεται ότι γίνεται μέτρηση του eGFR σε πάνω από 75% των κλινικών εργαστηρίων στις ΗΠΑ [20] οδηγώντας σε όλο και αυξανόμενη ανίχνευση της ΧΝΝ [21,22]. Στην κλινική πράξη οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι ο τύπος Cockcroft-Gault (C-G) και η εξίσωση Modification of Diet in Renal Disease Study (MDRD) [23] που θεωρείται και πιο ακριβής. Παρόλα αυτά οι εξισώσεις αυτές δεν είναι τέλειες και ο εκτιμώμενος GFR μπορεί να είναι υψηλότερος ή χαμηλότερος από το μετρούμενο και να επηρεάζεται από παραμέτρους όπως το στάδιο της νεφρικής νόσου, την ηλικία, το βάρος και την πρωτοπαθή νόσο. Για παράδειγμα, σε τιμές $GFR > 60 \text{ mL/min per } 1.73 \text{ m}^2$ η εξίσωση MDRD υποεκτιμά τον GFR, ενώ η εξίσωση C-G τον υπερεκτιμά. Αντίθετα, σε τιμές $GFR < 30 \text{ mL/min per } 1.73 \text{ m}^2$ και κυρίως στους υπερηλικες η εξίσωση MDRD υπερεκτιμά τον GFR [23-25], ενώ η εξίσωση C-G τον υποεκτιμά [26]. Επίσης, στους διαβητικούς ασθενείς η εξίσωση MDRD πλεονεκτεί σαφώς έναντι της εξίσωσης C-G [27] Ωστόσο τα τελευταία χρόνια η εξίσωση Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) αντικαθιστά προοδευτικά την εξίσωση MDRD γιατί θεωρείται πιο ακριβής κυρίως όταν ο $GFR > 60 \text{ mL/min per } 1.73 \text{ m}^2$ [28-31]. Στον πίνακα 2 φαίνονται οι πιο σημαντικοί τύποι υπολογισμού του GFR.

Πίνακας 2.	Εξισώσεις προσδιορισμού GFR
Cockcroft-Gault	$(140 - \text{ηλικία}) \times \text{βάρους} / 72 \times \text{κρεατ ορού (mg/dl)} \times 0,85$ αν η ασθενής είναι γυναίκα
MDRD 1	$186.3 \times \text{κρεατ ορού (mg/dl)}^{-1.154} \times \text{ηλικ.}^{-0.203} \times 0.742$ αν η ασθενής είναι γυναίκα, $\times 1.212$ αν ο ασθενής είναι της μαύρης φυλής
MDRD 2	$170 \times \text{κρεατ ορού (mg/dl)}^{-0.999} \times \text{ηλικ.}^{-0.176} \times \text{ουρία}^{-0.17} \times \text{αλβουμίνη}^{-0.318} \times 0.762$ αν η ασθενής είναι γυναίκα, $\times 1.18$ αν ο ασθενής είναι της μαύρης φυλής
CKD-EPI	$141 \times \text{min (κρεατ ορού/κ,1)}^a \times \text{max (κρεατ ορού/κ,1)}^{-1.209} \times 0.993^{\text{ηλικία}} \times 1.018$ [αν ο ασθενής είναι γυναίκα] $\times 1.159$ [αν ο ασθενής είναι νέγρος]

Στον ορισμό της ΧΝΝ συμπεριλαμβάνεται η νεφρική βλάβη, η οποία ανεξαρτήτως από τον GFR, ταυτοποιείται και από την παρουσία της αλβουμινουρίας, διαταραχών του ιζήματος ούρων, ανατομικών διαταραχών από απεικονιστικές μεθόδους, ιστολογικών διαταραχών σε βιοψίες νεφρού ή ιστορικό μεταμόσχευσης νεφρού. Η αλβουμινουρία είναι ο πιο αξιόπιστος δείκτης νεφρικής βλάβης και αντανακλά αυξημένη διαπερατότητα του σπειράματος σε διάφορα μόρια [32]. Μπορεί να οφείλεται σε πρωτοπαθή νεφρική βλάβη ή να είναι το αποτέλεσμα εμπλοκής του νεφρού σε μια συστηματική νόσο. Πιο συγκεκριμένα, η αλβουμινουρία μπορεί να αντιπροσωπεύει ενδοθηλιακή βλάβη, όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην υπέρταση, το διαβήτη και την παχυσαρκία. Αν και υπάρχουν διαφορετικοί μέθοδοι μέτρησης

(Πίνακας 3) και ορισμού της αλβουμινουρίας, η πιο εύχρηστη και αξιόπιστη μέθοδος είναι ο λόγος αλβουμίνη/κρεατινίνη (albumin/ creatinine ratio, ACR) σε τυχαίο δείγμα [32,34]

Πίνακας 3.	Ορισμός λευκωματουρίας και μικροαλβουμινουρίας		
	Φυσιολογική τιμές	Μικροαλβουμινουρία	Αλβουμινουρία ή κλινικά εμφανής λευκωματουρία
AER (mg/day)	<30	30-300	>300
PER (mg/day)	<150	150-500	>500
ACR (mg/g)	<30	30-300	>300
PCR (mg/g)	<150	150-500	>500

AER: albumin excretion rate; PER: protein excretion rate; ACR: albumin/creatinine ratio; PCR: protein/creatinine ratio

Με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες των KIDIGO, η αλβουμινουρία εκφρασμένη ως $ACR > 30 \text{ mg/g}$, ανεξαρτήτως της αιτιολογίας, πρέπει να θεωρείται επιπλέον παράμετρος για τον ορισμό της νεφρικής βλάβης [11,14-18]. Η προσθήκη της σταδιοποίησης της αλβουμινουρίας στον ορισμό της ΧΝΝ έγινε λόγω της σταδιακής αύξησης της θνητότητας και της ΧΝΝΤΣ σε υψηλότερα επίπεδα αλβουμινουρίας ανεξαρτήτως του GFR. Οι ασθενείς με νεφρική νόσο ανεξαρτήτως αιτιολογίας, με $ACR > 30 \text{ mg/g}$ παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο για θνησιμότητα από όλες τις αιτίες και από καρδιαγγειακό θάνατο, καθώς επίσης και για εμφάνιση ΧΝΝΤΣ και οξείας νεφρικής ανεπάρκειας, σε σχέση με ασθενείς χωρίς αλβουμινουρία, ακόμα και όταν ο GFR είναι φυσιολογικός [11,14-18]. Για παράδειγμα, άτομα με $ACR: 30-299 \text{ mg/g}$ και $GFR: 90-105 \text{ mL/min/1.73m}^2$ παρουσίασαν 11 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης ΧΝΝΤΣ σε σχέση με άτομα με παρόμοια νεφρική λειτουργία και $ACR < 30 \text{ mg/g}$.

Οι ασθενείς που έχουν διαγνωσθεί με ΧΝΝ διαχωρίζονται σε στάδια, όπως έχουν διατυπωθεί στην αναθεωρημένη ταξινόμηση των κατευθυντήριων οδηγιών KIDIGO, σύμφωνα με 6 κατηγορίες GFR (G stages), 3 κατηγορίες αλβουμινουρίας (A stages) και την πρωτοπαθή αιτία της νεφρικής νόσου (Πίνακας 4) [11].

Πίνακας 4. Αναθεωρημένη ταξινόμηση της ΧΝΝ βάσει του eGFR και της αλβουμινουρίας

Στάδια ΧΝΝ	GFR (mL/min/1.73m²)	Περιγραφή
G1	>90	Φυσιολογικό ή αυξημένο
G2	60-89	Ήπια μειωμένο
G3a	45-59	Ήπια προς μέτρια μειωμένο
G3b	30-44	Μέτρια προς βαριά μειωμένο
G4	15-29	Βαριά μειωμένο
G5	<15	Νεφρική ανεπάρκεια (όταν G5D σε AMK)

Στάδια αλβουμινουρίας	AER (mg/day)	Περιγραφή
A1	<30	Φυσιολογική προς ηπίως αυξημένη
A2	30-300	Μετρίως αυξημένη
A3	>300	Σοβαρά αυξημένη (μπορεί να διαχωρισθεί σε νεφρωσικού και μη νεφρωσικού τύπου)

Ο σκοπός της ταξινόμησης είναι να οδηγήσει στη διαχείριση συμπεριλαμβανομένου τη διαστρωμάτωση του κινδύνου για την εξέλιξη της ΧΝΝ και των πιθανών παρενέργειών της. Η διαστρωμάτωση του κινδύνου είναι πολύ σημαντική γιατί επιτρέπει καλύτερη παρακολούθηση και συμμόρφωση των ασθενών. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για ανεύρεση και εφαρμογή κατάλληλων θεραπειών [1,4].

1.3. Επιδημιολογία της ΧΝΝ

Όπως προαναφέρθηκε, η ΧΝΝ είναι ένα τεράστιο επιδημιολογικό πρόβλημα το οποίο σταδιακά διογκώνεται. Ο επιπολασμός της ΧΝΝ στις ΗΠΑ, όπως αυτή ορίστηκε με βάση τον eGFR <60 mL/min per 1.73 m² με τη μέθοδο MDRD και/ή την παρουσία της αλβουμινουρίας, φαίνεται να έχει αυξηθεί σημαντικά στην περίοδο από το 1999 έως το 2004 σε σύγκριση με την περίοδο από το 1988 έως το 1994 (13.1 % versus 10.0%) όπως φάνηκε από την μελέτη των Coreshetal [34-28]. Επίσης, στοιχεία που προέκυψαν από τη βάση δεδομένων της μελέτης NHANES (Third National Health and Nutrition Examination Survey) από το 2003 έως το 2006) με τον eGFR μετρούμενο με τη μέθοδο CKD-EPI, έδειξαν ότι ο ολικός επιπολασμός των σταδίων 1 έως 5 ήταν 14.2% [5,29].

Έχουν γίνει επίσης μελέτες που προσδιόρισαν τον επιπολασμό της ΧΝΝ σε άλλες χώρες. Έχει αναφερθεί σε διάφορες μελέτες ότι τα ποσοστά κυμαίνονται μεταξύ από 1 έως 30% [39-44]. Έτσι λοιπόν, σε πληθυσμό της Νορβηγίας, ο επιπολασμός της ΧΝΝ, η οποία ορίστηκε με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες του K/DOQI, ήταν 10.2%, ποσοστό παρόμοιο με αυτό που αναφέρθηκε στις ΗΠΑ. Παρόλα αυτά, ο σχετικός κίνδυνος για εξέλιξη της νόσου σε ΧΝΝΤΣ ήταν μεγαλύτερος στους ασθενείς των ΗΠΑ [45]. Αντίθετα σε άλλες χώρες τα ποσοστά ήταν χαμηλότερα, όπως για παράδειγμα στην Ταιβάν (7%) [44] και στην Ισλανδία (5%) [40]. Ωστόσο, η σύγκριση μεταξύ των κρατών είναι δύσκολη λόγω των διαφορών που υπάρχουν στο σχεδιασμό

μεταξύ των μελετών, στις διαφορές του ορισμού της ΧΝΝ και των ελλειπόν στοιχείων για σημαντικούς παράγοντες όπως η ηλικία και η συν-νοσηρότητα.

Άλλες έρευνες ασχολήθηκαν με τις φυλετικές και εθνικές διαφορές στον επιπολασμό και την επίπτωση της ΧΝΝΤΣ [46,47]. Πράγματι, η μεγαλύτερη επίπτωση έχει αναφερθεί στους Αφροαμερικανούς και ακολουθούν οι Ινδιάνοι της Αμερικής, οι Ασιάτες της Αμερικής και τελευταίοι οι Καυκάσιοι [46]. Επίσης, υπάρχουν διαφορές σχετικά με την αιτιολογία της ΧΝΝΤΣ ανάμεσα στις διάφορες φυλές και εθνότητες. Έτσι λοιπόν, ενώ η διαβητική νεφροπάθεια θεωρείται η πιο συχνή αιτία ΧΝΝΤΣ σε όλες τις εθνότητες με χαρακτηριστικό παράδειγμα το ποσοστό 43,9% όπως φαίνεται από τα στοιχεία της United Renal Data System [5,6], η υπερτασική νεφροπάθεια αποτελεί την πιο σημαντική αιτία ΧΝΝΤΣ στους Αφροαμερικανούς (33%) σε αντίθεση με τις υπόλοιπες εθνότητες που αποτελεί περίπου το 25% των ασθενών με ΧΝΝΤΣ [48].

Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή, ο επιπολασμός της ΧΝΝΤΣ αυξάνεται όλο και περισσότερο, όπως φαίνεται από προγράμματα ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης των ΗΠΑ. Οι πιθανές αιτίες αυτής της αύξησης περιλαμβάνουν την βελτίωση επιβίωσης από μη νεφρολογικές ασθένειες (κυρίως καρδιαγγειακή νόσος) και τα πιο χαλαρά κριτήρια για την ένταξη σε προγράμματα εξωνεφρικής κάθαρσης. Ωστόσο, πρέπει να τονισθεί, ότι μόνο ένα ποσοστό ασθενών με ΧΝΝ θα καταλήξει σε ΧΝΝΤΣ. Παρόλα αυτά, είναι πολύ λίγα τα στοιχεία που παρακολουθούν τη φυσική εξέλιξη της νόσου στα διάφορα στάδια της. Ειδικά για τα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ που λόγω της έλλειψης συμπτωμάτων συχνά υποδιαγιγνώσκονται, οι γνώσεις μας σχετικά με το ποσοστό που θα καταλήξει σε τελικό στάδιο, είναι ελάχιστες. Πρόσφατα, ο Turin et al [49] παρουσίασε μερικές πολύ σημαντικές εκτιμήσεις σχετικά με την πιθανότητα εμφάνισης ΧΝΝΤΣ κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου, εκμεταλλευόμενος την επιδημιολογική βάση δεδομένων του Καναδά. Βασιζόμενος σε συνολικό πληθυσμό περίπου 3 εκατομμυρίων ατόμων, υπολόγισε ότι η πιθανότητα εμφάνισης ΧΝΝΤΣ κατά τη διάρκεια της ζωής τους ήταν 2,66% για τους άντρες και 1,76% για τις γυναίκες. Το βασικό αυτής της μελέτης δεν ήταν τόσο η ακρίβεια των εκτιμήσεων όσο η δυνατότητα προβλέψεων ανάλογα με το στάδιο της ΧΝΝ. Για παράδειγμα, άντρες 40 ετών με eGFR 45-59ml/min/1.73m² παρουσίασαν 7 φορές αυξημένο ποσοστό κινδύνου ΧΝΝΤΣ σε σχέση με άντρες της ίδιας ηλικίας με eGFR 60-89ml/min/1.73m² [49]. Παρόμοιες μελέτες που θα περιλαμβάνουν επιπρόσθετους παράγοντες κινδύνου πρέπει να γίνουν ώστε να προσδιοριστούν οι πιο σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες εξέλιξης της ΧΝΝ έτσι ώστε να είναι δυνατή μια πιο στοχευμένη θεραπεία.

Κεφάλαιο 2. Διαβητική Νεφροπάθεια

2.1. Εισαγωγή

Η Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ) είναι μια ασθένεια που συμβαίνει σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) τύπου 1 (ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης) και τύπου 2 (μη ινσουλινοεξαρτώμενος) καθώς μετά από παγκρεατίτιδα ή παγκρεατεκτομή όπου η διάρκεια του διαβήτη είναι αρκετά μεγάλη και τα επίπεδα του σακχάρου αρκετά υψηλά ώστε να οδηγήσουν σε επιπλοκές. Πρόκειται για μια σπειραματοπάθεια η οποία προσδιορίζεται από χαρακτηριστικές δομικές και λειτουργικές διαταραχές. Οι βασικές δομικές διαταραχές περιλαμβάνουν διεύρυνση του μεσαγγείου, πάχυνση της βασικής σπειραματικής μεμβράνης και σπειραματική σκλήρυνση. Οι βασικές κλινικές εκδηλώσεις της ΔΝ είναι η πρωτεϊνουρία, λιγότερο συχνά η αιματουρία και σε κάποιους ασθενείς η εξελισσόμενη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, η οποία μπορεί να επιβραδυνθεί ή να προληφθεί με την κατάλληλη θεραπεία. Μια από τις πρώιμες λειτουργικές διαταραχές είναι η υπερδιήθηση στα πολύ αρχικά στάδια της νόσου. Σε πιο προχωρημένα στάδια εμφανίζεται η μικροαλβουμινουρία (που ορίζεται ως η απέκκριση αλβουμίνης μεταξύ 30 και 300mg/day ή μεταξύ 30 και 300mg/g κρεατινίνης σε τυχαίο δείγμα ούρησης) και στη συνέχεια η μακροαλβουμινουρία (απέκκριση αλβουμίνης μεγαλύτερης των 300mg/day ή μεγαλύτερης 300mg/g κρεατινίνης). Η μικροαλβουμινουρία προηγείται της μακροαλβουμινουρίας και αποτελεί εύρημα που προβλέπει αυξημένο κίνδυνο νεφροπάθειας. Όταν δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία, η έναρξη σοβαρής απώλειας αλβουμίνης ακολουθείται συνήθως από προοδευτική μείωση του GFR με τελικό αποτέλεσμα τη νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου [50].

Ωστόσο, για λόγους που δεν είναι κατανοητοί, ο βαθμός αλβουμινουρίας δεν συνδέεται απαραίτητα με την εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς με ΔΝ που συνδέεται είτε με τύπου 1 ή τύπου 2 ΣΔ [51-53]. Αυτό απεικονίζεται σε μια έρευνα (Joslin Kidney Study) 79 ασθενών με ΣΔ τύπου 1 οι οποίοι παρακολουθήθηκαν για μέσο όρο 12 χρόνων μετά την έναρξη της μικροαλβουμινουρίας. Είκοσι τρεις ασθενείς εξελίχθηκαν σε προχωρημένο στάδιο της νόσου (GFR<60ml/min). Από αυτούς τους ασθενείς οι 11 δεν εμφάνισαν αύξηση της αλβουμινουρίας ενώ οι υπόλοιποι 12 ανέπτυξαν πρωτεϊνουρία η οποία συνήθως συνοδεύεται αλλά δεν προηγείται απαραίτητα της μείωσης του GFR. Οι ασθενείς που εξελίχθηκαν σε σοβαρή πρωτεϊνουρία είχαν και το μεγαλύτερο ρυθμό απώλειας του GFR [51].

Επίσης πρέπει να αναφέρουμε ότι υπάρχουν ασθενείς με ΔΝ χωρίς πρωτεϊνουρία, που εμφανίζουν επιδείνωση νεφρικής τους λειτουργίας, ωστόσο οι υπεύθυνοι παράγοντες δεν είναι γνωστοί. Σαν πιθανή αιτία προτάθηκε η ενδονεφρική αγγειακή νόσος. Παρόλα αυτά, σε μια μελέτη με ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και GFR<60ml/min, οι μετρούμενες ενδονεφρικές αντιστάσεις ήταν ισότιμα αυξημένες σε ασθενείς με και χωρίς πρωτεϊνουρία [53]. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι η εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς χωρίς πρωτεϊνουρία συμβαίνει συνήθως στον ΣΔ τύπου 1, που είναι ένας πληθυσμός ηλικιακά πολύ νεότερος από αυτούς με ΣΔ τύπου 2 και έχουν λιγότερες

πιθανότητες να εμφανίζουν ενδονεφρική αγγειακή νόσο. Περαιτέρω έρευνες πρέπει να γίνουν ώστε να διευκρινισθεί ο ακριβής ρόλος της πρωτεϊνουρίας στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου.

2.2.Επιδημιολογία της ΔΝ

Η σύνδεση πρωτεϊνουρίας με τον ΣΔ περιεγράφηκε για πρώτη φορά στα βιβλιογραφικά δεδομένα στο τέλος του 18^{ου} αιώνα. Τη δεκαετία του 1930 οι Kimmelstiel και Wilson περιέγραψαν για πρώτη φορά την παθολογική οξώδη σπειραματοσκλήρυνση του διαβήτη και την συσχέτισαν με την πρωτεϊνουρία και την υπέρταση [54]. Στο τέλος της δεκαετίας του 1950, η νεφρική νόσος αναγνωρίστηκε επίσης ως μια κοινή επιπλοκή του διαβήτη. Σήμερα, η ΔΝ είναι η πιο συχνή αιτία νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου στις ΗΠΑ [5,6] και σε άλλες αναπτυγμένες χώρες. Η επίπτωση της νόσου έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Περίπου 20 με 40% των ασθενών με διαβήτη τελικά καταλήγουν σε ΔΝ, αν και ο λόγος γιατί όλοι οι ασθενείς με διαβήτη δεν αναπτύσσουν αυτή την επιπλοκή δεν είναι πλήρως κατανοητό. Επίσης, η θνησιμότητα στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς με διαβήτη είναι 22% υψηλότερη τον πρώτο χρόνο μετά την έναρξη της αιμοκάθαρσης και 15% υψηλότερη στα 5 χρόνια σε σχέση με τους αιμοκαθαιρόμενους χωρίς διαβήτη [55].

α) Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1.

Η επιδημιολογία της ΔΝ είναι καλύτερα μελετημένη σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 1, γιατί ο χρόνος της κλινικής έναρξης της νόσου συνήθως είναι γνωστός. Παλαιότερα, πριν την ορθή ρύθμιση του σακχάρου και της αρτηριακής πίεσης, 25 έως 45% των διαβητικών ασθενών ανέπτυσαν κλινικά έκδηλη νόσο [56-59]. Επίσης η συνολική επίπτωση της ΧΝΝΤΣ ήταν επίσης σημαντική, με αναφερόμενα ποσοστά 4 έως 17% στα 20 χρόνια από την αρχική διάγνωση και περίπου 16% στα 30 χρόνια [60,61]. Μεταγενέστερες έρευνες έδειξαν ότι η νεφρική πρόγνωση του ΣΔ τύπου 1, συμπεριλαμβανομένου του ρυθμού εξέλιξης σε ΧΝΝΤΣ, έχει βελτιωθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες [62]. Πράγματι, συνήθως το 20-30% των ασθενών παρουσιάζουν μικροαλβουμιουρία μετά από μέση διάρκεια του διαβήτη 15 ετών και λιγότεροι από το 50% των ασθενών αυτών θα εμφανίσουν ΔΝ [56]. Επίσης, οι ασθενείς που δεν έχουν πρωτεϊνουρία μετά από 20 με 25 χρόνια με διαβήτη, παρουσιάζουν κίνδυνο ανάπτυξης έκδηλης νεφρικής νόσου μόνο 1% ανά έτος. Μια μετρίως αυξημένη πρωτεϊνουρία μπορεί να παραμείνει σταθερή ή και να υποστρέψει σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών το οποίο πιθανά σχετίζεται με τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και του γλυκαιμικού προφίλ. Πράγματι, η ορθή ρύθμιση του σακχάρου και η πιο επιθετική μείωση της αρτηριακής πίεσης με φάρμακα του άξονα ρενίνης- αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, έχει δείξει ότι μειώνει τον ρυθμό εξέλιξης- αν όχι προλαμβάνει- τη ΔΝ.

β) Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2

Στην Καυκασιανή φυλή ο επιπολασμός της εξελισσόμενης νεφρικής νόσου είναι μικρότερος στους ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 σε σχέση με τους τύπου 1 [63]. Παρόλα αυτά, αυτή η παρατήρηση μπορεί να οφείλεται στη συνήθως καθυστερημένη έναρξη της νόσου και στη μικρότερη διάρκεια έκθεση στο διαβήτη στους ασθενείς με ΣΔ τύπου 2, αν και μια ομάδα αυτών ασθενών έχουν πιο δυσοίωνα πρόγνωση. Όπως περιεγράφηκε προηγουμένως, η χρήση μοντέρνων θεραπειών μειώνει την επίπτωση της νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου. Νεότερα στοιχεία δηλώνουν ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης νεφρικής νόσου είναι ισότιμος στους δύο τύπους ΣΔ. Πράγματι μια έρευνα έδειξε ότι ο χρόνος εμφάνισης πρωτεϊνουρίας από την έναρξη του διαβήτη και ο χρόνος εξέλιξης σε ΧΝΝΤΣ από την έναρξη της πρωτεϊνουρίας, ήταν παρόμοιος και στους δύο τύπους ΣΔ [64]. Περίπου 3% των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με ΣΔ τύπου 2 έχουν έκδηλη νεφροπάθεια. Η μέγιστη συχνότητα συνήθως εμφανίζεται σε ασθενείς με ιστορικό διαβήτη 10-20 ετών, ενώ μετά από αυτό το χρονικό περιθώριο ο ρυθμός προοδευτικά μειώνεται [65]. Ωστόσο, τα περισσότερα στοιχεία σχετικά με την ανάπτυξη της ΔΝ πηγάζουν από μια μεγάλη βρετανική έρευνα που στρατολόγησε 5100 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς που ανήκαν στη λευκή φυλή με ΣΔ τύπου 2 και μελέτησε τις επιπλοκές του διαβήτη, συμπεριλαμβανομένου της νεφρικής ανεπάρκειας [United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)] [66]. Σύμφωνα με την έρευνα, στα 10 χρόνια μετά την διάγνωση, ο επιπολασμός της μικροαλβουμινουρίας είναι 25%, της σοβαρής πρωτεϊνουρίας 5%, ενώ η εξέλιξη της νόσου σε ΧΝΝΤΣ 0.8%.

Επίσης, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι η επίπτωση της ΔΝ διαφοροποιείται ανάλογα με τη φυλή. Πράγματι, είναι ιδιαίτερα μεγάλη κυρίως στη μαύρη φυλή (όπου η συχνότητα είναι 3 έως 6 φορές μεγαλύτερη από αυτή των λευκών), στους Μεξικανούς Αμερικανούς και στους Ινδιάνους της φυλής Pima. Ειδικά οι τελευταίοι, μετά από 20 χρόνια με ΣΔ, περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς ανέπτυξαν διαβητική νεφροπάθεια, με το 15% των ασθενών να έχει ΧΝΝΤΣ [67]. Η σχετικά αυξημένη συχνότητα της νόσου σε γενετικά ανόμοιους πληθυσμούς, υποδηλώνει ότι κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες όπως η διαίτα, κακή ρύθμιση του σακχάρου, της αρτηριακής υπέρτασης και η παχυσαρκία, έχουν πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη της ΔΝ. Επίσης υποδεικνύει ότι η οικογενής προδιάθεση πιθανά να παίζει κάποιο ρόλο.

2.3. Παθογένεια της ΔΝ

Η ΔΝ έχει συγκεκριμένες φάσεις εξέλιξης. Λειτουργικές αλλαγές επέρχονται στο νεφρό στο επίπεδο του σπειράματος, συμπεριλαμβανομένου της υπερδιήθησης και της υπεραιμάτωσης, πριν την έναρξη οποιασδήποτε κλινικής διαταραχής. Στη συνέχεια, λαμβάνουν χώρα πάχυνση της βασικής μεμβράνης, πειραματική υπερτροφία και διεύρυνση του μεσαγγείου. Έρευνες σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 έδειξαν ότι όταν συνυπάρχει μικροαλβουμινουρία και οι προαναφερθείσες ιστολογικές διαταραχές, παρατηρείται εξέλιξη σε κλινικά έκδηλη νεφροπάθεια [68]. Ωστόσο, η μικροαλβουμινουρία έχει μεταβλητή πορεία, ενώ η εξέλιξή της σε

μακροαλβουμινουρία (>300mg/d) είναι μη προβλέψιμη και δεν οδηγεί πάντα σε ανάπτυξη νεφροπάθειας [68]. Επιπλέον, ο ρυθμός μείωσης της νεφρικής λειτουργίας μετά την ανάπτυξη της νεφροπάθειας μεταβάλλεται ανάλογα με τον ασθενή και επηρεάζεται από επιπρόσθετους παράγοντες όπως η αρτηριακή πίεση και η ρύθμιση του σακχάρου.

Πολλαπλοί μηχανισμοί συμβάλουν στην ανάπτυξη και την έκβαση της νόσου, όπως η αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικής προδιάθεσης και μεταβολικών και αιμοδυναμικών διαταραχών επαγόμενων από την υπεργλυκαιμία [69]. Αιμοδυναμικοί παράγοντες ενεργοποιούν αγγειοδραστικά συστήματα όπως το σύστημα της ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS) και το σύστημα ενδοθηλίνης. Ως απάντηση, αυξάνει η έκκριση προϊνωτικών κιτοκινών, όπως ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β1 (transforming growth factor β1 (TGF-β1)) με αποτέλεσμα να λαμβάνουν χώρα περαιτέρω αιμοδυναμικές αλλαγές όπως αυξημένη συστηματική και ενδοσπειραματική πίεση. Επίσης, η συμμετοχή μεταβολικών μονοπατιών, οδηγεί σε μη ενζυματική γλυκοζυλίωση, αυξημένη δραστηριότητα της πρωτεΐνης C κινάσης (PCK) και ανώμαλο μεταβολισμό πολυολών. Ευρήματα από διάφορες έρευνες υποστηρίζουν σχέση μεταξύ αυξημένης έκκριση φλεγμονωδών μορίων όπως κιτοκινών και αυξητικών παραγόντων και ανάπτυξη ΔΝ [70-71], ενώ άλλες υποστηρίζουν πως το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο [72]. Τα τελευταία χρόνια διάφορες έρευνες έριξαν φως στην παθογένεια της νόσου με τη μελέτη των αναστολέων των μονοπατιών που εμπλέκονται στην γένεση της ΔΝ, ωστόσο δεν έχουν βρεθεί ακόμα αποτελεσματικές θεραπευτικές μέθοδοι για την επιβράδυνση της νόσου [71]. Παρακάτω θα αναλύσουμε μερικούς από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεση της ΔΝ.

α) Αιμοδυναμικά μονοπάτια.

Τα πρώτα σημάδια της σπειραματικής υπεραϊμάτωσης και υπερδιήθησης προέρχονται από μειωμένη αντίσταση τόσο του προσαγωγού και λιγότερο του απαγωγού αρτηριολίου του σπειράματος. Πολλοί παράγοντες φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτήν την ελαττωματική αυτορύθμιση, όπως τα προστανοειδή, νιτρικό οξίδιο, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF), ο TGF-β1 και το RAAS. Αυτές οι αιμοδυναμικές διαταραχές διευκολύνουν τη διαρροή αλβουμίνης από τα σπειραματικά τριχοειδή και την υπερπαραγωγή μεσαγγειακής θεμέλειας ουσίας καθώς και την πάχυνση της βασικής μεμβράνης και τον τραυματισμό των ποδοκυττάρων [73]. Επίσης η αυξημένη μηχανική τάση από αυτές τις αιμοδυναμικές διαταραχές επάγει τοπική απελευθέρωση διαφόρων κιτοκινών και αυξητικών παραγόντων [74,75]. Οι αιμοδυναμικές διαταραχές στο νεφρό επάγονται μερικώς από τις ορμόνες αγγειοτενσίνη II και ενδοθηλίνη. Η σπειραματική υπέρταση και υπερδιήθηση συμβάλουν στην ανάπτυξη της ΔΝ όπως φαίνεται και από την χρήση αναστολέων του RAAS, οι οποίοι διατηρούν τη νεφρική λειτουργία. Οι αναστολείς του RAAS ανταγωνίζονται την προϊνωτική δράση της αγγειοτενσίνης II μειώνοντας την ενεργοποίησή της από τον TGF-β1 [76].

β) Υπεργλυκαιμία και τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης (advanced glycosylation end products, AGEs).

Η υπεργλυκαιμία είναι ένας βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη διαβητικής νεφροπάθειας, λόγω της επίδρασής της στα πειραματικά και μεσαγγειακά κύτταρα. Τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι σημαντικά για τη διατήρηση της πειραματικής τριχοειδικής δομής και τη διαμόρφωση της πειραματικής διήθησης μέσω δραστηριότητας των λείων μυϊκών κυττάρων. Έρευνες in vitro έχουν δείξει ότι η υπεργλυκαιμία συνδέεται με αύξηση του πολλαπλασιασμού και υπερτροφία των μεσαγγειακών κυττάρων καθώς επίσης και πάχυνση της βασικής μεμβράνης. Επίσης, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η υπεργλυκαιμία μπορεί να αυξήσει την έκφραση του VEGF στα ποδοκύτταρα, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να αυξήσει σημαντικά την αγγειακή διαπερατότητα [77]. Παρόλα αυτά, η υπεργλυκαιμία δεν ευθύνεται εξ' ολοκλήρου για τη ΔΝ, όπως μαρτυρούν έρευνες όπου νεφροί από μη διαβητικούς δότες μεταμοσχεύθηκαν σε ασθενείς με διαβήτη και η νεφροπάθεια αναπτύχθηκε ανεξάρτητα από τη ρύθμιση του σακχάρου [78].

Στη χρόνια υπεργλυκαιμία μέρος της περίσσειας της γλυκόζης, συνδέεται με αμινοξέα πάνω στις κυκλοφορούντες ή τις ιστικές πρωτεΐνες. Η μη ενζυματική γλυκοζυλίωση επηρεάζει τη βασική μεμβράνη και άλλους παράγοντες του σπειράματος και οδηγεί στη δημιουργία αρχικά αναστρέψιμων και στη συνέχεια μη αναστρέψιμων AGEs. Αυτά τα προϊόντα εμπλέκονται με την παθογένεια της ΔΝ μεταβάλλοντας τη μεταγωγή του σήματος μέσω αλλαγής σε επίπεδο διαλυτών σημάτων όπως κυτοκίνες, ορμόνες και ελεύθερες ρίζες. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα των AGEs είναι αυξημένα σε ασθενείς με διαβήτη, και κυρίως στους ασθενείς που συνυπάρχει νεφρική ανεπάρκεια, επειδή έχουν νεφρική απέκκριση [79]. Ως αποτέλεσμα είναι η συσσώρευσή τους στους ιστούς το οποίο συμβάλει στις μικροαγγειακές επιπλοκές του διαβήτη συμπεριλαμβανομένου και της νεφρικής ανεπάρκειας.

Η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (protein kinase C, PCK) αποτελεί επίσης ένα πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου η υπεργλυκαιμία μπορεί να οδηγήσει σε ΔΝ [80]. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση αυτού του ενζύμου προκαλεί αυξημένη έκκριση αγγειοδιασταλτικών προστανοειδών, τα οποία συμβάλουν στη πειραματική υπερδιήθηση. Επίσης, μέσω της ενεργοποίησης του TGF-β1, η PCK αυξάνει την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας από τα μεσαγγειακά κύτταρα [81].

γ) Προρενίνη

Αποτελέσματα κλινικών μελετών έδειξαν ότι η αυξημένη δραστηριότητα της προρενίνης του πλάσματος είναι ένας παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ΔΝ [82]. Ο υποδοχέας της προρενίνης στο νεφρό βρίσκεται στο μεσάγγειο και στα ποδοκύτταρα και ενώνεται με ένα ειδικό υποδοχέα ο οποίος πυροδοτεί την ενεργοποίηση των κινάσων που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (mitogen-activated proteine kinase, (MAPK) p44/p42). Η ενεργοποίηση αυτή της οδού των κινάσων οδηγεί σε πολλαπλασιασμό του κυττάρου και σε υπερέκφραση των γονιδίων του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (plasminogen activator inhibitor, PAI-1) και του

TGF-β1. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπερπλασία των μεσαγγειακών κυττάρων στο νεφρό, των ινοβλαστών και των λείων μυϊκών κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα, καθώς και την ανάπτυξη νεφρικής ίνωσης [83]. Ο πιθανός ρόλος της προρενίνης στη παθογένεια της ΔΝ προτάθηκε μετά από μια μελέτη σε ζωικά μοντέλα του διαβήτη (ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε στρεπτοζοκίνη), όπου ο παρατεταμένος αποκλεισμός του υποδοχέα της προρενίνης ανέστειλε την ενεργοποίηση του MAPK και εμπόδισε την εξέλιξη της νεφροπάθειας, ανεξαρτήτως της δραστηριότητας της αγγιοτενσίνης II [84]. Με βάση τα παραπάνω, αν η προρενίνη είναι βασικός παράγοντας για την παθογένεια της νόσου, η χρήση των αναστολέων της ρενίνης για την αντιμετώπιση της υπέρτασης, οι οποίοι αυξάνουν την συγκέντρωση των επιπέδων της προρενίνης πιθανά να έχουν βλαβερές συνέπειες.

δ) Οξειδωτικό στρες

Η μεταβολική δραστηριότητα στους νεφρώνες παράγει μια μεγάλη ποσότητα αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ελεύθερες ρίζες) τα οποία αντισταθμίζονται από ένα μεγάλο αριθμό αντιοξειδωτικών ενζύμων και συστήματα καθαρισμού ελεύθερων ριζών. Όπως είναι γνωστό τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου προκαλούν αρνητικές βιολογικές επιπτώσεις όπως υπεροξειδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, οξείδωση των πρωτεϊνών, νεφρική αγγειοσύσπαση και βλάβη του DNA. Η υπεργλυκαιμία ευνοεί την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου [85]. Υπάρχει η άποψη ότι η υπεργλυκαιμία επάγει οξειδωτικό στρες πριν ο διαβήτης να γίνει κλινικά εμφανής. Έρευνα έδειξε ότι τα επίπεδα των δεικτών βλάβης του DNA επαγόμενα από ελεύθερες ρίζες, είναι υψηλότερα στους ασθενείς με κλινικά πιο σοβαρή νεφροπάθεια. Επίσης, η ιστολογική ανάλυση βιοπτικού υλικού από ανθρώπινο νεφρό, έδειξε προϊόντα γλυκο-οξειδωσης (συνδυασμένα προϊόντα γλυκοζυλίωσης και οξείδωσης πρωτεϊνών) στα μεσαγγειακά και πειραματικά κύτταρα, ενώ αυτές οι βλάβες είναι λιγότερο συχνές σε δείγματα από ασθενείς χωρίς διαβήτη [86-87].

ε) Νεφρίνη

Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να ενοχοποιείται για την παθογένεια της ΔΝ είναι η μειωμένη έκφραση της νεφρίνης. Η νεφρίνη είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στα ποδοκύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ακεραιότητας του φραγμού διήθησης. Πράγματι, ασθενείς με ΔΝ έχουν σημαντικά χαμηλότερη έκφραση νεφρίνης και λιγότερα σχισμοειδή διαφράγματα σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς διαβήτη [88]. Επίσης η απέκκριση της νεφρίνης είναι αυξημένη κατά 17-30% στους ασθενείς με διαβήτη (με και χωρίς αλβουμινουρία) σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς διαβήτη. Επομένως, η απέκκριση της νεφρίνης μπορεί να αποτελέσει ένα πρώιμο δείκτη της βλάβης των ποδοκυττάρων, ακόμα και πριν την εμφάνιση της αλβουμινουρίας [74,75]. Η θεραπεία με αναστολείς του RAAS μπορεί να προστατέψουν την έκφραση της νεφρίνης. Σε μια έρευνα ασθενών με ΣΔ τύπου 2, η θεραπεία για 2 χρόνια με ένα αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιοτενσίνης διατήρησε τα επίπεδα της νεφρίνης σταθερά σε σχέση με τους ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία [89].

στ) Κυτοκίνες

Η ενεργοποίηση διαφόρων προφλεγμονωδών παραγόντων όπως κυτοκίνες, χημειοκίνες και αυξητικοί παράγοντες φαίνεται να εμπλέκονται στη παθογένεια της ΔΝ. Ο ρόλος τους θα αναλυθεί εκτενώς παρακάτω.

ζ) Γενετική προδιάθεση

Η γενετική προδιάθεση φαίνεται ότι επιδρά σημαντικά τόσο στην επίπτωση όσο και στη σοβαρότητα της ΔΝ [90]. Πράγματι, η πιθανότητα ανάπτυξης νεφροπάθειας στους ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 ή 2, αυξάνεται σημαντικά όταν υπάρχει γονιός ή αδερφός με ΔΝ [91-93]. Μια μελέτη αξιολόγησε οικογένειες Ινδιάνων της φυλής Pima στις οποίες δύο διαδοχικές γενιές είχαν ΣΔ τύπου 2 [92]. Η πιθανότητα των απόγονων να αναπτύξουν πρωτεϊνουρία ήταν 14% όταν κανένας από τους γονείς δεν είχε πρωτεϊνουρία, 23% όταν ο ένας γονιός είχε πρωτεϊνουρία και 46% όταν και οι δύο γονείς είχαν πρωτεϊνουρία.

Η πρόοδος στη μοριακή γενετική οδήγησε στην ανάπτυξη ενός συστήματος προσδιορισμού των γονιδιακών πολυμορφισμών σε ένα νουκλεοτίδιο (single-nucleotide polymorphisms, SNP's) και έδωσε τη δυνατότητα ταυτοποίησης συγκεκριμένων χρωμοσωμιακών θέσεων (loci) που πιθανόν να περιέχουν γονίδια υπεύθυνα για τη νόσο. Έχουν ταυτοποιηθεί χρωμοσωμικές θέσεις που είναι υπεύθυνες για την προδιάθεση της ΔΝ στις περιοχές των χρωμοσωμάτων 7q21.3, 10p15.3, 14q23.1 και 18q22.3 [94,95]. Οι μελέτες συσχέτισης των υποψηφίων γονιδίων είναι η πιο κοινή προσέγγιση για τη ταυτοποίηση των υπεύθυνων γονιδίων. Οι περισσότερες έρευνες έχουν εξετάσει τους πολυμορφισμούς του γονιδίου του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (angiotensin convertin genzyme, (ACE)), ωστόσο τα αποτελέσματα ήταν αντικρουόμενα. Στους ασθενείς με ΣΔ τύπου 2, ο DD πολυμορφισμός του ACE γονιδίου, έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΔΝ, σοβαρή πρωτεϊνουρία, επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας και θνητότητα κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης [96-98]. Επίσης έρευνα με 1000 ασθενείς λευκής φυλής με ΣΔ τύπου 1 έδειξε δυνατή συσχέτιση μεταξύ γενετικών μεταλλάξεων του ACE γονιδίου και ανάπτυξη νεφροπάθειας [99]. Ωστόσο, μια Ευρωπαϊκή έρευνα βασισμένη στη μελέτη οικογενειών, δεν βρήκε συσχέτιση μεταξύ ΔΝ και ACE πολυμορφισμούς στους ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 [100]. Επίσης, παραλλαγές του PKC β 1 γονιδίου έχουν συσχετισθεί με νεφρική νόσο σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2. Τέσσερις κοινοί πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου ήταν ανεξάρτητα συσχετιζόμενοι με τη ΧΝΝΤΣ σε δύο μεγάλες ομάδες με κινέζους ασθενείς [101]. Οι μελέτες σε εξέλιξη χρησιμοποιούν μια πολυγονιδιακή προσέγγιση της ΔΝ, αφού η πιθανότητα να είναι μια μονογονιδιακή νόσος φαίνεται να είναι μικρή.

Κεφάλαιο 3. Ο ρόλος της φλεγμονής στη ΧΝΝ και στη ΔΝ

3.1. Φλεγμονή και ΧΝΝ

Η φλεγμονή μπορεί να οριστεί σαν μια περίπλοκη βιολογική απάντηση του οργανισμού σε επιβλαβή ερεθίσματα, όπως παθογόνοι μικροοργανισμοί ή κατεστραμμένα κύτταρα. Θεωρητικά, θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μια προσπάθεια προστασίας του οργανισμού να αποβάλει τα επιβλαβή ερεθίσματα και να ξεκινήσει διαδικασία επούλωσης των ιστών. Αν και η απελευθέρωση των φλεγμονωδών πρωτεϊνών, κυρίως κυτοκινών, μπορεί να έχει ωφέλιμη επίδραση σε οξείες καταστάσεις, η χρόνια συστηματική αύξησή τους μπορεί να προκαλέσει βλαβερές επιπτώσεις στα κύτταρα και τους ιστούς. Η χρόνια συστηματική φλεγμονή και η σχέση της με την κακή πρόγνωση στη ΧΝΝ, είναι γνωστές στο χώρο της νεφρολογίας περισσότερο από δέκα χρόνια [102,103]. Παρόλα αυτά υπάρχει ακόμα έντονο ενδιαφέρον για τη μελέτη των δεικτών φλεγμονής στη νεφρική νόσο. Υπάρχουν διάφοροι λόγοι που θα μπορούσαν να αιτιολογήσουν αυτό το ενδιαφέρον: α) πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι στο γενικό πληθυσμό η χρόνια φλεγμονή μπορεί να παίζει πιο σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση και την καρδιαγγειακή νόσο παρά η LDL υπερχοληστερολαιμία [104]. Αυτή η άποψη θα μπορούσε να οδηγήσει στην αναζήτηση διαφορετικών από τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου κατά Framingham [105] β) η φλεγμονή φαίνεται να είναι ένας από τους λόγους του υψηλού ποσοστού καρδιαγγειακής νόσου και θνητότητας σε ασθενείς με ΧΝΝ [106], γ) οι ασθενείς με ΧΝΝ και υψηλούς δείκτες φλεγμονής (όπως CRP) παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό εξέλιξης της νεφρικής νόσου και μεγαλύτερη θνητότητα [107], δ) δεν υπάρχουν τυχαιοποιημένες μελέτες με αντιφλεγμονώδη θεραπεία που να ελέγχει την υπόθεση αν η χρόνια φλεγμονή συμβάλει στη νοσηρότητα και τη θνητότητα στη ΧΝΝ [108].

Οι ασθενείς με ΧΝΝ χαρακτηρίζονται από μια χρόνια προφλεγμονώδη κατάσταση, η οποία συμβάλει στην αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα. Η φλεγμονή συμβάλει επίσης στην εξέλιξη της ΧΝΝ επάγοντας την απελευθέρωση των κυτοκινών και την αυξημένη παραγωγή και δραστηριότητα των μορίων προσκόλλησης, που προκαλούν την προσκόλληση των T κυττάρων και τη μετανάστευσή τους στο διάμεσο χώρο, και ακολούθως προσελκύουν προ-ινωτικούς παράγοντες. Η φλεγμονή στη ΧΝΝ προκαλεί θνητότητα κυρίως λόγω καρδιαγγειακής νόσου μέσω της ανάπτυξης αγγειακών επασβεστώσεων και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας [109].

3.2. Ο ρόλος των κυτοκινών στη ΧΝΝ

Οι κυτοκίνες είναι διαλυτές πρωτεΐνες αγγελιοφόροι (soluble protein messenger) οι οποίες παράγονται από ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών κυττάρων (αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells, APCs) όπως μακροφάγα και δένδριτικά κύτταρα ή από λεμφοκύτταρα) ασκούν τη δράση τους σε τοπικό ή συστηματικό επίπεδο τροποποιώντας και ρυθμίζοντας τις ανοσολογικές και

φλεγμονώδεις αντιδράσεις μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών (εικόνα 1). Παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην φυσική όσο και στην ειδική ανοσία.



Εικόνα 1. Ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέονται με κυτοκίνες

Ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες και έχουν πλειοτροπική δράση σε διαφορετικούς στόχους με αυτοκρινή ή και παρακρινή τρόπο [110]. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι κυτοκίνες συνήθως εμφανίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμες στα βιολογικά υγρά ή στους ιστούς. Οι περισσότερες πληροφορίες που έχουμε σχετικά με τη δράση των κυτοκινών προέρχονται κυρίως από την επώαση κυττάρων μαζί με κυτοκίνες, κάτι που θα μπορούσε να είναι παραπλανητικό για δύο κυρίως λόγους. Πρώτον, οι κυτοκίνες δεν ενεργούν ως μια μοναδική ουσία που ενεργεί σε κάποιο καθορισμένο κύτταρο. Κάποιος θα μπορούσε να σκεφτεί το δίκτυο των κυτοκινών σαν ένα «ιστό αράχνης» όπου η κίνηση του ενός ‘κόμπου’ οδηγεί σε μετακίνηση πολλών άλλων. Δεύτερον, οι κυτοκίνες δεν έχουν μόνο τοπική αλλά και συστηματική δράση και σημαντικό μέρος των δράσεων των κυτοκινών είναι παράκρινος και δύσκολο να ανιχνευθούν. Έτσι λοιπόν, η μέτρηση των κυτοκινών στο πλάσμα μπορεί να μην είναι πάντα αντιπροσωπευτική [110]. Μερικά από τα χαρακτηριστικά των κυτοκινών φαίνονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά των κυτοκινών

- Η παραγωγή των κυτοκινών σε φυσιολογικές συνθήκες είναι χαμηλή έως μηδενική
- Η παραγωγή ρυθμίζεται από διάφορα ερεθίσματα στο επίπεδο της μεταγραφής ή της μετάφρασης
- Η παραγωγή των κυτοκινών είναι παροδική και η ακτίνα δράσης τους μπορεί να είναι μικρή
- Ασκούν τη δράση τους μέσω της ένωσης με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας υψηλής συγγένειας
- Η δράση τους συνήθως οδηγεί σε μεταβολές του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αλλαγές στην κυτταρική διαφοροποίηση και αλλαγές στην αναμενόμενη λειτουργία των κυττάρων
- Συχνά έχουν πολλαπλούς στόχους και πολλαπλές δράσεις (πλειοτροπική δράση)
- Η έκθεση των κυττάρων συγχρόνως σε διάφορες κυτοκίνες μπορεί να οδηγήσει σε ποιοτικά διαφορετικές απαντήσεις (συνέργεια/ανταγωνισμός)
- Οι κυτοκίνες μπορούν να διαφοροποιήσουν την έκφραση των υποδοχέων άλλων κυτοκινών
- Οι κυτοκίνες μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή άλλων κυτοκινών

Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες αντισταθμίζονται σε διάφορα επίπεδα από κυτοκίνες με αντιφλεγμονώδη δράση. Για παράδειγμα, η έκκριση της Interleukin-1β (IL-1β) συνδέεται με την έκκριση του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (Interleukin-1 receptor antagonist, IL-1RA), ο οποίος ανταγωνίζεται τη δράση της κυτοκίνης [111]. Κάτι ανάλογο συμβαίνει με τον παράγοντα νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor, TNF-α) ο οποίος ανταγωνίζεται από διαλυτούς υποδοχείς TNF [112]. Επίσης υπάρχει μια λειτουργική ισορροπία ανάμεσα σε προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η IL-10. Όλα τα ερεθίσματα τα οποία επάγουν προφλεγμονώδη δράση σε ανοσοϊκανά (immunocompetent) κύτταρα, επάγουν επίσης και την IL-10, η οποία τελικά περιορίζει την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών [110]. Στη ΧΝΑ, η ισορροπία αυτή ανάμεσα στις προφλεγμονώδεις και τις αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες είναι διαταραγμένη ενώ οι συγκεντρώσεις των κυτοκινών είναι αυξημένες λόγω τόσο της μειωμένης κάθαρσής τους όσο και της αυξημένης παραγωγής τους [113]. Οι φλεγμονώδεις απαντήσεις επαγόμενες από κυτοκίνες έχουν εμπλακεί στην παθογένεια της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας (ONA), ΧΝΝ, ΧΝΝΤΣ, διάφορες σπειραματονεφρίτιδες και της μεταμόσχευσης νεφρού [110].

Αυξημένη παραγωγή κυτοκινών έχει περιγραφεί στη ΧΝΝΤΣ. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε συγκεκριμένες κυτοκίνες οι οποίες μετρήθηκαν στο πλάσμα, σε υπερκείμενα καλλιέργειας ή σε συνδυασμό με κυκλοφορούντα κύτταρα. Η αξιολόγηση απελευθέρωσης των κυτοκινών στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς περιπλέκεται από το γεγονός ότι η διαδικασία της αιμοκάθαρσης από μόνη της πιθανά προκαλεί περεταίρω παραγωγή κυτοκινών. Έρευνες *in vitro* και *in vivo* υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η μεταγραφή και η παραγωγή κυτοκινών, όπως οι IL-1, IL-6 και TNF-α, κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης, προκαλείται κυρίως από την άμεση επαφή των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος με τη μεμβράνη αιμοκάθαρσης, τα ενεργά θραύσματα του συμπληρώματος (C3a, C5a, C5b-9) που παράγονται κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης και από την ανάστροφη μεταφορά του βακτηριακού υλικού (λιποπολυσακχαρίτες, LPS) από το διάλυμα στο αίμα. Διάφορες παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με την ΧΝΝΤΣ φαίνεται ότι σχετίζονται με την παραγωγή κυτοκινών [114]. Πράγματι, υπάρχει η θεωρία ότι οι διαταραχές ύπνου που παρατηρούνται στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς μπορεί να οφείλονται σε διαταραχές διαφόρων νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο, επαγόμενες από κυτοκίνες όπως οι IL-1 και TNF-α, οι οποίες εμπλέκονται στη φυσιολογική ρύθμιση του ύπνου και την παραγωγή ύπνου βραδέων κυμάτων [115]. Επιπλέον η υπόταση κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης, μια συχνή παρενέργεια που παρατηρείται στο 15 έως 50% των συνεδρίων, έχει συσχετισθεί με την σύνθεση IL-1 και TNF-α στα μονοκύτταρα. Η υπόταση στην αιμοκάθαρση πιθανά να προκύπτει από την επαγόμενη από κυτοκίνες σύνθεση ενός ισχυρού αγγειοδιασταλτικού, του μονοξειδίου του αζώτου [110]. Οι κυτοκίνες επίσης είναι γνωστοί ρυθμιστικοί παράγοντες ερυθροποίησης κυρίως σε παθολογικές καταστάσεις. Χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα κυκλοφορούντων κυτοκινών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αναιμία λόγω μειωμένης απάντησης στην ερυθροποιητίνη. Υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ δόσης ερυθροποιητίνης και παραγωγής IL-6 και TNF-α σε ενεργοποιημένα και μη

ενεργοποιημένα μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος [110]. Επίσης κάποιες έρευνες αναφέρουν ότι πιθανά οι κυτταρικές μεμβράνες ενισχύουν τον ενεργό καταβολισμό μέσω της αύξησης της απελευθέρωσης των κυτοκινών, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην υποθρεψία που συχνά παρατηρείται σε αυτούς τους ασθενείς. Πράγματι, είναι γνωστό ότι η IL-1 δρα ενεργά στον υποθάλαμο προκαλώντας ανορεξία, ενώ σε αιμοκαθαρόμενους ασθενείς, τα υψηλά επίπεδα της IL-6 συσχετίζονται με υποαλβουμιναιμία και μεγαλύτερη απώλεια βάρους [116]. Επιπλέον, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι οι αιμοκαθαρόμενοι ασθενείς παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε λοιμώξεις, το οποίο μπορεί εν μέρει να αποδοθεί στην ανεπαρκή και καθυστερημένη απελευθέρωση κυτοκινών προκαλώντας μείωση της ανοσολογικής απάντησης και κατά συνέπεια αύξησης του κινδύνου λοιμώξεων. Πιο συγκεκριμένα, η επαφή των κυκλοφορούντων μονοπύρηννων κυττάρων με τη μεμβράνη αιμοκάθαρσης, οδηγεί σε αυξημένη γονιδιακή έκφραση κυτοκινών η οποία όμως δεν αντιστοιχεί σε αυξημένη μετάφραση τους σε πρωτεΐνες [114]. Τέλος, ειδικά η IL-6 θεωρείται ο πιο αξιόπιστος προγνωστικός παράγοντας θνησιμότητας σε ασθενείς υπό αιμοκάθαρση [117].

Οι σπειραματονεφρίτιδες αποτελούν μια πολύ σημαντική αιτία φλεγμονής στο νεφρό και λαμβάνουν χώρα κυρίως μέσω της ειδικής ανοσίας, όπου οι κυτοκίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και ρύθμιση των φλεγμονωδών απαντήσεων [118]. Πιο συγκεκριμένα, τα διηθητικά T λεμφοκύτταρα μπορούν να προκαλέσουν ιστική βλάβη, είτε άμεσα μέσω κυτταροτοξικών λειτουργιών και έκκριση κυτοκινών, είτε έμμεσα ενεργοποιώντας τα μακροφάγα [119]. Αυτές οι ανοσολογικές απαντήσεις στο νεφρό περιλαμβάνουν τη συστηματική αυτοανοσία ενάντια σε μη νεφρικά αντιγόνα (πχ. ουδετεροφιλικά αντιγόνα στην ANCA-associated αγγειίτιδα και πυρηνικά αντιγόνα στη νεφρίτιδα λύκου), ειδική αυτοανοσία (organ-specific) (πχ αντιγόνα έναντι της βασικής μεμβράνης (GBM αντιγόνα) στην anti-GBM σπειραματονεφρίτιδα και προστατευτική ανοσία έναντι διαφόρων εξωγενών αντιγόνων, όπου ο νεφρός τραυματίζεται κατά τη διάρκεια κάθαρσης των ανοσοσυμπλεγμάτων [118]. Θα αναφέρουμε ενδεικτικά κάποια παραδείγματα του ρόλου των κυτοκινών στις σπειραματονεφρίτιδες. Όπως γνωρίζουμε, η νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων οφείλεται σε διαταραχή λειτουργίας των T-κυττάρων οδηγώντας σε δυσλειτουργία των ποδοκυττάρων. Επίσης, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι η πρωτεϊνουρία επάγεται από τις κυτοκίνες και συγκεκριμένα από την IL-4, η οποία παράγεται από τα T-κύτταρα. Πράγματι, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα IL-4 στον ορό, ενώ έρευνες in vitro έδειξαν αυξημένη παραγωγή από περιφερικά μονοκύτταρα σε ασθενείς με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων [120]. Αντιθέτως, λιγότερα δεδομένα υπάρχουν στην εστιακή τμηματική σπειραματονεφρίτιδα (FSGS). Πιθανό ρόλο στη φλεγμονή φαίνεται να έχει ο TNF- α , όπως έχουν δείξει έρευνες με αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με FSGS. Επίσης, ο αυξημένος αυξητικός παράγοντας TGF- β αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης ποδοκυττάρων. Η απέκκριση του TGF- β είναι αυξημένη στους ασθενείς με FSGS και συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της διάμεσης ίνωσης [121]. Στην IgA νεφροπάθεια, η ανάπτυξη της φλεγμονής στο σπείραμα έχει συνδεθεί με διάφορες κυτοκίνες. Πιθανά

τόσο οι προφλεγμονώδεις όσο και οι αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου. Η ανοσοσφαιρίνη IgA είναι πλημμελώς γλυκοζυωμένη και η εναπόθεσή της στο μεσάγγειο ακολουθείται από μεσαγγειακή υπερπλασία και χρόνια σπειραματική φλεγμονή. Η IL-1 εκφράζεται στα σπειράματα των ασθενών αυτών και μπορεί να εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων και την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, ενώ η IL-1Ra κατέχει το ρόλο του φυσικού παράγοντα αποκλεισμού φλεγμονής που έχει προκαλέσει η IL-1. Επίσης έρευνα έχει δείξει ότι η παραγωγή της IL-4 από μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος σε ασθενείς με IgA ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με φυσιολογικούς ασθενείς και ασθενείς άλλων τύπων μεσαγγειοϋπερπλαστικών σπειραματονεφρίτιδων. Πιθανολογείται λοιπόν ότι η IL-4 παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της IgA νεφροπάθειας κυρίως διαμορφώνοντας τη λειτουργία των B κυττάρων. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι η ιντερφερόνη γ (INF- γ) η οποία παράγεται από μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος, πιθανά να επάγει τη σύνθεση φλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1 β , IL-6, TNF- α) από κύτταρα του νεφρού [122]. Στις αγγειίτιδες νεφρού και κυρίως στις ANCA- θετικές αγγειίτιδες οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες TNF- α και IL-1 β , ενεργοποιούν ουδετερόφιλα ώστε να παρουσιάσουν αντιγόνα αζουροφιλικών κοκκιδίων στην επιφάνειά τους οδηγώντας στην παραγωγή του ANCA. Κατά συνέπεια, ακολουθεί ενεργοποίηση και αποκοκκίωση των λευκοκυττάρων και στη συνέχεια απελευθέρωση ελεύθερων ριζών και διήθηση του διάμεσου ιστού από ουδετερόφιλα και μακροφάγα. Έρευνα έδειξε ότι τα επίπεδα ούρων των προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-6, IL-8, TNF- α) είναι αυξημένα στους ασθενείς με ενεργό ANCA-θετική αγγειίτιδα και θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτη παρακολούθησης της ενεργότητας της νόσου [123]. Τέλος, στο λύκο τα υψηλά επίπεδα ορού της IL-6 έχουν προταθεί ως δείκτης ενεργότητας της νόσου και πιθανά ειδικός δείκτης νεφρικής προσβολής. Επίσης υπάρχουν κάποιες ενδείξεις για τα επίπεδα ορού και πιθανά ούρων του TNF- α που μπορεί να σχετίζονται με την ενεργότητα της νόσου και τον υψηλό τίτλο του αντισώματος anti-dsDNA [123]. Η γνώση της διαδικασίας της ιστολογικής βλάβης από κυτοκίνες είναι πολύ σημαντική γιατί μπορεί να επιτρέψει την ανάπτυξη επιλεγμένων θεραπευτικών στόχων.

3.3. Ο ρόλος της φλεγμονής στη ΔΝ

Όπως προαναφέρθηκε, η ΔΝ είναι η σοβαρότερη αιτία νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου. Τα τελευταία χρόνια, ο μεγάλος αριθμός ερευνών και η πρόοδος που έχει γίνει στη μελέτη του σακχαρώδη διαβήτη και των παρενεργειών του, έχει αλλάξει τον τρόπο που σκεφτόμαστε για αυτή την ασθένεια. Όλο και περισσότερες ενδείξεις υποστηρίζουν ότι ασθενείς που εμφανίζουν ΣΔ έχουν χαρακτηριστικά φλεγμονής χρόνια πριν την έναρξη της νόσου. Επιπλέον, σε πληθυσμιακές μελέτες έχει φανεί ότι φλεγμονώδεις παράμετροι είναι ισχυροί προγνωστικοί παράγοντες ανάπτυξης του διαβήτη και των μικροαγγειακών παρενεργειών του συμπεριλαμβανομένου της νευροπάθειας, της αμφιβληστοειδοπάθειας και της νεφροπάθειας. Παράλληλα, οι γνώσεις των παθοφυσιολογικών διαδικασιών που οδηγούν σε ΔΝ, έχουν σημαντικά βελτιωθεί σε γενετικό και μοριακό επίπεδο. Έτσι, η κλασική άποψη των μεταβολικών

και αιμοδυναμικών μεταβολών ως βασικής αιτιολογίας νεφρικής βλάβης του διαβήτη έχει σημαντικά αλλάξει, με ξεκάθαρες ενδείξεις να υποδεικνύουν ότι αυτοί οι παραδοσιακοί παράγοντες είναι μόνο μέρος μιας πιο πολύπλοκης διαδικασίας. Πράγματι, αν και η ΔΝ θεωρούνταν παραδοσιακά μια μη ανοσολογική οντότητα, πολλές έρευνες υποδεικνύουν ότι η χρόνια χαμηλού βαθμού φλεγμονή και η ενεργοποίηση του φυσικού ανοσολογικού συστήματος, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την πρόοδο της νόσου [124,125]. Διάφορα κύτταρα όπως τα λευκοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα [126-128], καθώς επίσης και άλλα μόρια όπως κυτοκίνες (IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α), χυμοκίνες, (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) [129,130], μόρια προσκόλλησης (intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1) [131,132], ένζυμα (cyclooxygenase-2, nitric oxide synthase) [133,134], αυξητικοί παράγοντες (vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF), TGF- β) [135-138] και πυρηνικοί παράγοντες NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [139,140] εμπλέκονται στις διαδικασίες που σχετίζονται με τη ΔΝ.

Το 1991, ο Hasegawa et al, υποστήριξαν για πρώτη φορά ότι οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες μπορούν να συμμετάσχουν στην ανάπτυξη της ΔΝ. Έδειξαν ότι τα μακροφάγα επωαζόμενα με βασική σπειραματική μεμβράνη από διαβητικά ποντίκια παρήγαγαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα IL-1 και TNF- α σε σχέση με μακροφάγα που είχαν επωασθεί με μεμβράνες μη διαβητικών ποντικών [141,142]. Σήμερα, γνωρίζουμε ότι ανάμεσα στις κυτοκίνες, οι IL-1, IL-6, IL-18 και TNF- α έχουν πιο ενεργό ρόλο στην ανάπτυξη της ΔΝ. Επίσης, πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από τα ανοσοϊκανά κύτταρα, διάφορα ενδογενή νεφρικά κύτταρα, όπως ενδοθηλιακά, μεσαγγειακά, σπειραματικά και σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα είναι ικανά να παράγουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες [124,125].

Η IL-1 αυξάνει την αγγειακή ενδοθηλιακή διαπερατότητα και έχει εμπλακεί στον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων και τη σύνθεση της θεμέλιας ουσίας, καθώς επίσης και στην ανάπτυξη των ενδοσπειραματικών αιμοδυναμικών ανωμαλιών συσχετιζόμενες με τη σύνθεση προσταγλαδινών από μεσαγγειακά κύτταρα [143,144]. Όσον αναφορά τη IL-6 ο DallaVestra et al, έδειξε ότι ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 με κλινικά έκδηλη νεφροπάθεια παρουσίασαν υψηλά επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένου της IL-6, τα οποία ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με αυξημένη πάχυνση της βασικής μεμβράνης, που αποτελεί σημαντική βλάβη της διαβητικής νεφροπάθειας [145]. Επιπλέον παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της πάχυνσης της βασικής μεμβράνης και της IL-6. Συγκεκριμένα, αυτή η κυτοκίνη ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων, ενισχύει την έκφραση της φιβρονεκτίνης, επηρεάζει την δυναμική της θεμέλιας ουσίας σε επίπεδο μεσαγγείου και ποδοκυττάρου και αυξάνει την διαπερατότητα του ενδοθηλίου [145,146]. Τέλος, στην ομάδα των ιντερλευκινών με προφλεγμονώδη δραστηριότητα συγκαταλέγεται η IL-18, ένας νεότερος δείκτης φλεγμονής, η οποία όπως αναφέρθηκε σε έρευνα του Morigaki et al, εμφανιζόταν σε υψηλότερα επίπεδα στον ορό σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 σε σχέση με φυσιολογικά άτομα. Επίσης η αύξησης της κυτοκίνης συσχετιζόταν με την αλβουμινουρία [147]. Σε μεταγενέστερη έρευνα ο

Nakamura et al, έδειξε ότι η αλβουμινουρία σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 είχε ανεξάρτητη συσχέτιση με τα επίπεδα της IL-18 στον ορό και τα ούρα [148].

Εκτός από τις ιντερλευκίνες, άλλη μια κυτοκίνη που φαίνεται να παίζει ρόλο στη ΔΝ είναι ο TNF-α. Ο TNF-α παράγεται κυρίως από μονοκύτταρα και τα μακροφάγα αλλά και από ενδογενή νεφρικά κύτταρα [149,150]. Έχει εμπλακεί στην αιμοδυναμική ανισορροπία ανάμεσα σε αγγειοδιασταλτικούς και αγγειοσυσπαστικούς παράγοντες που προκαλεί διαταραχές στην ενδοσπειραματική αιματική ροή και στο ρυθμό σπειραματικής διήθησης [151]. Επίσης αυτή η κυτοκίνη είναι τοξική στο σπείραμα, στο μεσόγγειο και τα επιθηλιακά κύτταρα και μπορεί να προκαλέσει άμεση νεφρική βλάβη [152]. Πρόσφατα, πειρατική έρευνα σε ποντίκια έδειξε ότι η mRNA έκφραση του TNF-α ήταν αυξημένη περίπου 2.5 φορές περισσότερο στα πειραματικά μοντέλα ποντικών με ΔΝ σε σχέση με τα φυσιολογικά, ενώ συσχετιζόταν σημαντικά με την πρωτεϊνουρία [153]. Εκτός από τις πειραματικές μελέτες, κλινικές μελέτες έχουν βρει μια άμεση και σημαντική συσχέτιση μεταξύ του TNF-α ορού και πρωτεϊνουρίας σε διαβητικούς ασθενείς με φυσιολογική νεφρική λειτουργία και μικροαλβουμίνη καθώς επίσης σε ασθενείς με κλινικά έκδηλη νεφροπάθεια και νεφρική ανεπάρκεια [154,155]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί αύξηση της απέκκρισης του TNF-α όσο εξελίσσεται η ΔΝ, ενώ η πολυπαραγοντική ανάλυση έχει δείξει σημαντική και ανεξάρτητη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων TNF-α ούρων και πρωτεϊνουρίας. Είναι σημαντικό αναφέρουμε ότι σε αυτές τις μελέτες δεν έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα του TNF-α ορού και ούρων, κάνοντας πιθανή την ενδονεφρική παραγωγή της συγκεκριμένης κυτοκίνης [154].

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε επίσης το ρόλο ενός φλεγμονώδους παράγοντα, μιας χυμοκίνης, της MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) που φαίνεται να διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο στη παθογένεια της ΔΝ [156]. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η συσσώρευση μακροφάγων στο νεφρό συνδέεται με νεφρική βλάβη στη ΔΝ. Τα μονοκύτταρα έλκονται στην περιοχή βλάβης οργάνου από χυμοκίνες ειδικές για μονοκύτταρα. Έτσι τα μονοκύτταρα μεταναστεύουν από το αγγειακό σύστημα στους ιστούς ακολουθώντας τις χυμοκίνες με σημαντικότερη την MCP-1, επηρεάζοντας έτσι τόσο την στρατολόγηση όσο και λειτουργία των μονοκυττάρων. Σε μια σχετικά πρόσφατη μελέτη ο Chow et al, έδειξε ότι η συσσώρευση και η ενεργοποίηση των μακροφάγων επαγόμενη από την χυμοκίνη MCP-1, είναι ένας ουσιώδης μηχανισμός για την ανάπτυξη των πρώτων σταδίων της ΔΝ σε πειραματικά μοντέλα ποντικών [157]. Αυτά τα ευρήματα δίνουν μια πειραματική εξήγηση των αποτελεσμάτων των κλινικών ερευνών που έχουν δείξει ότι η αύξηση των επιπέδων της MCP-1 στο νεφρό είναι χαρακτηριστικό της νεφρικής βλάβης από διαβήτη, η οποία συνδέεται με στρατολόγηση μακροφάγων, πρωτεϊνουρία, διαμεσοσωληναριακή βλάβη και εξέλιξη της νόσου [158-160]. Βλέπουμε λοιπόν ότι, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες με τη δράση τους επηρεάζουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη της ΔΝ, ενώ η αναγνώρισή τους ως σημαντικός παθογενετικός παράγοντας της νεφρικής βλάβης από το διαβήτη, αποτελεί από τους ερευνητές θεραπευτικό στόχο.

3.4. Αυξητικοί παράγοντες και ο ρόλος τους στη νεφρική ίνωση

Η κοινή παθολογική μεταβολή σε κάθε εξελισσόμενη μορφή χρόνιας νεφρικής νόσου είναι νεφρική ίνωση. Η νεφρική ίνωση χαρακτηρίζεται από σωληνιαριακή ατροφία, υπερβολική εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και αλλαγές στη νεφρική αγγείωση. Αποτελεί επίσης χαρακτηριστική βλάβη χρόνιας νεφροπάθειας του μοσχεύματος και της αρτηριονεφρο σκλήρυνσης. Δυστυχώς δεν υπάρχουν ειδικές θεραπευτικές επιλογές για τη αποτελεσματική θεραπεία της νεφρικής ίνωσης, παρά το γεγονός ότι έχει ταυτοποιηθεί ένας σημαντικός αριθμός πιθανών θεραπευτικών στόχων. Ανάμεσα σε αυτούς τους στόχους, φαίνεται πως κεντρικό ρόλο στη διαδικασία δημιουργίας της ίνωσης κατέχουν οι αυξητικοί παράγοντες.

Ο TGF- β πιστεύεται ότι είναι κεντρικός 'μεσολαβητής' της ίνωσης. Αυτό μπορεί εν μέρει να οφείλεται στο γεγονός ότι ιστορικά ήταν ο πρώτος προϊνωτικός παράγοντας που περιεγράφηκε. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αποτελεί ένα από τους πολλούς παράγοντες της ίνωσης που δρα σε συνεργασία με άλλα μόρια. Έτσι λοιπόν δεν πρέπει να θεωρείται σταθερός δείκτης της ίνωσης, επειδή σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να αυξηθεί παρά τη μείωση της ίνωσης. Ο TGF- β ασκεί τις διάφορες βιολογικές και ανοσολογικές λειτουργίες του μέσω πολύπλοκων σηματοδοτικών μονοπατιών [161]. Υπάρχουν τρεις ισομορφές, οTGF- β 1, - β 2 και - β 3. Περίπου όλες οι έρευνες έχουν μελετήσει τον TGF- β 1, οποίος συνήθως για χάριν συντομίας αναφέρεται ως TGF- β . Οι άλλες δύο ισομορφές πιθανά να έχουν ανάλογες προϊνωτικές επιδράσεις στο νεφρό αλλά ο ρόλος τους παραμένει να διευκρινισθεί. Οι εξέχουσες προϊνωτικές επιδράσεις του TGF- β 1 στη νεφρική ίνωση έχει φανεί σε πειράματα σε ποντίκια μετά από επαγόμενη σωληνιαριακή υπερέκφραση του TGF- β 1. Ένας μέσος όρος 4 ημερών υπερέκφρασης οδηγεί σε σημαντική ίνωση του διάμεσου ιστού, πολλαπλασιασμό των ινωβλαστών και σωληνιαριακή αποδιαφοροποίηση [162]. Αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντος TGF- β 1 έχει προταθεί ως πιθανός βιοδείκτης της εξέλιξης της ΧΝΝ [163]. Επίσης, οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του TGF- β 1 θα μπορούσαν να παίξουν ένα ρόλο ως προδιαθεσικοί παράγοντες για της εξέλιξη της νεφρικής νόσου. Παρόλα αυτά, επειδή τόσο τα κυκλοφορούντα επίπεδα όσο και οι πολυμορφισμοί συσχετίζονται με την υπέρταση, πιστεύεται ότι αυτό περιορίζει την ειδικότητα του TGF- β 1 [164].

Ένας άλλος αυξητικός παράγοντας, ο platelet derived growth factor (PDGF) πιστεύεται πως είναι σημαντικός μιτογόνος παράγοντας και παράγοντας ενεργοποίησης για κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης και εμπλέκεται στην διαδικασία της ίνωσης σε διάφορα όργανα [165]. Το σύστημα του PDGFπεριλαμβάνει 4 αλυσίδες που σχηματίζουν 5 διμερή, PDGF-AA, -BB, -AB, -CC και -DD. Οι δύο τελευταίες ισομορφές έχουν ανακαλυφθεί σχετικά πρόσφατα. Ο ρόλος του PDGF στις μεσαγγειούπερπλαστικές σπειραματονεφρίτιδες είναι σχετικά γνωστός, ενώ υπάρχουν ελλιπή στοιχεία σχετικά με την νεφρική διαμεσοσωληνιαριακή ίνωση [166]. Οι ισομορφές που έχουν μελετηθεί καλύτερα στη νεφροσωληνιαριακή ίνωση είναι ο PDGF-BB και ο PDGF-DD. Πράγματι, πειραματική έρευνα έδειξε ότι η καθημερινή χορήγηση της ισομορφής PDGF-BB για μία βδομάδα κατέληξε σε ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό, καθώς επίσης και απόπτωση των ινωβλαστών του διάμεσου ιστού

και τελικά ίνωση σε πειραματικά μοντέλα ποντικών [167]. Άλλες έρευνες σε ποντίκια με εξελισσόμενη μεσαγγειοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα, έδειξαν ότι η πρόιμη αναστολή του PDGF-BB και του PDGF-DD μείωσε τη διαμεσοσωληναριακή ίνωση [168]. Επίσης, μια σχετικά πρόσφατη κλινική μελέτη, έδειξε ότι τα επίπεδα PDGF-DD στον ορό, ήταν στατιστικά υψηλότερα στους ασθενείς με IgA νεφροπάθεια σε σχέση με φυσιολογικά άτομα [169]. Ωστόσο, παραμένει να διευκρινισθεί αν ο PDGF-DD υπερεκφράζεται στη νεφροσωληναριακή ίνωση και αν τα επίπεδα ορού ή ούρων του συγκεκριμένου αυξητικού παράγοντα μπορούν να αποτελέσουν πιθανό δείκτη της ίνωσης.

Υπάρχει η αντίληψη ότι η αραίωση των τριχοειδικών αγγείων και η υποξία είναι βασικά χαρακτηριστικά της ίνωσης, που παρατηρούνται σε πιο προχωρημένα στάδια [170]. Έτσι λοιπόν ο αυξητικός παράγοντας VEGF θα μπορούσε θεωρητικά να συμβάλει στη σωληναριοδιάμεση αγγειογένεση και την ίνωση, ωστόσο ο ρόλος του δεν είναι πλήρως κατανοητός. Πρόκειται για μια οικογένεια που περιλαμβάνει 5 αυξητικούς. Η VEGF-A ισομορφή είναι η πρώτη που έχει περιγράψει και καλύτερα μελετηθεί και συχνά στη βιβλιογραφία ονομάζεται απλά VEGF [171]. Οι διαφορές της ίνωσης ανάλογα με τα στάδια της νεφρικής νόσου καθώς επίσης και οι παθοφυσιολογικές διαφορές στις διάφορες νεφρικές νόσους, πιθανά να μπορούν να εξηγήσουν τα αντιφατικά στοιχεία που υπάρχουν σχετικά με το ρόλο του VEGF-A στη νεφρική ίνωση. Έτσι λοιπόν, ενώ η έγχυση VEGF-A μείωσε τη νεφρική βλάβη σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με ίνωση από ασθένειες όπως νεφροπάθεια από κυκλοσπορίνη, νεφρεκτομή και θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια [171-173], αντίθετα σε άλλες έρευνες η αναστολή του VEGF-A μέσω εξουδετερωτικού αντισώματος μείωσε την πρόιμη νεφρική βλάβη σε μοντέλα ποντικών με νεφρεκτομή, με ΔN και ποντίκια σιτιζόμενα με υψηλή πρωτεϊνική δίαιτα [174-177]. Ο ρόλος των υπόλοιπων ισομορφών του VEGF στη νεφρική ίνωση είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Είναι πολλοί αυτοί που υποστηρίζουν ότι δεδομένου της πολυπλοκότητας του συστήματος του VEGF και των ελλειπών στοιχείων στη σωληναροδιάμεση ίνωση και αγγειογένεση, είναι σχετικά απίθανο να δούμε θεραπεία της νεφρικής ίνωσης βασιζόμενη στο VEGF τουλάχιστον στο εγγύς μέλλον [178].

Κεφάλαιο 4. Υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like Receptors, TLRs)

4.1. Εισαγωγή

Όπως προαναφέρθηκε, η φλεγμονή είναι βασική συνιστώσα της παθοφυσιολογίας διαφόρων νεφρικών νοσημάτων. Ακόμα και για τα παραδοσιακά μη ανοσολογικά νοσήματα όπως η ΔΝ, τα τελευταία χρόνια υπάρχουν έρευνες που υποδεικνύουν ότι η χρόνια χαμηλού βαθμού φλεγμονή και η ενεργοποίηση του φυσικού ανοσολογικού συστήματος, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την πρόοδο της νόσου. Ενδείξεις από νεφρικές βιοψίες μαρτυρούν ότι η συσσώρευση μακροφάγων στους διαβητικούς νεφρούς συνδέεται με επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, προτείνοντας ένα παθογενετικό ρόλο των κυττάρων αυτών στη ΔΝ [179]. Αν και η πρόοδος στο χώρο της νεφρολογίας και της ανοσολογίας έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη και την εφαρμογή ανοσοτροποποιητικών παραγόντων για κάποια νεφρικά νοσήματα, η έκβασή τους παραμένει φτωχή, υποδεικνύοντας σημαντικά κενά όσον αφορά τις γνώσεις μας στην παθοφυσιολογία αρκετών νεφρικών νοσημάτων.

Τόσο η έναρξη όσο και η εξέλιξη της φλεγμονώδους ανοσολογικής απάντησης διαμεσολαβούνται από ένα μεγάλο αριθμό υποδοχέων σε συνδυασμό με τους συνδέτες τους. Ειδικότερα οι TLRs έχουν προταθεί ως διαμεσολαβητές των ανοσολογικών μηχανισμών που εμπλέκονται στη παθογένεια διαφόρων νεφρικών νοσημάτων. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς δρουν ως «αισθητήρες μικροβίων» και κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στο συντονισμό της πρώτης γραμμής άμυνας του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων ή/και της ιστικής βλάβης τραυματισμού. Η ανακάλυψή τους μπορεί να ενισχύσει την κατανόηση παθοφυσιολογίας του νεφρού και να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων και πιο αποτελεσματικών θεραπειών.

4.2. Εισαγωγικά στοιχεία στο ανοσιακό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου αποτελείται από 2 διακριτές οντότητες, την φυσική (ή εγγενής) και την ειδική (ή επίκτητη) ανοσία μέσω των οποίων καθορίζεται η ανοσολογική απάντηση του οργανισμού έναντι δυνητικά επιβλαβών παραγόντων. Η επίκτητη ανοσία βασίζεται στην κλωνική επιλογή λεμφοκυττάρων που παράγουν μια μεγάλη ποικιλία ειδικών αντιγονικών υποδοχέων που επιτρέπουν στο ανοσοποιητικό σύστημα να αναγνωρίσει κάθε ξένο αντιγόνο [180]. Η φυσική ανοσία προβάλλει την πρώτη γραμμή άμυνας κατά πολλών συνήθων μικροοργανισμών και είναι ουσιώδης για τον έλεγχο κοινών βακτηριακών λοιμώξεων. Τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έναρξη και μετέπειτα στον προσανατολισμό της ειδικής ανοσολογικής απάντησης. Επίσης, επειδή η ειδική απάντηση καθυστερεί 4-5 μέρες για να γίνει αποτελεσματική, η φυσική ανοσία κατέχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των λοιμώξεων αυτό το χρονικό διάστημα.

Τα κύρια κύτταρα του φυσικού ανοσιακού συστήματος είναι τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν στην επιφάνειά τους ειδικούς υποδοχείς που αναγνωρίζουν κοινά συστατικά των βακτηρίων και

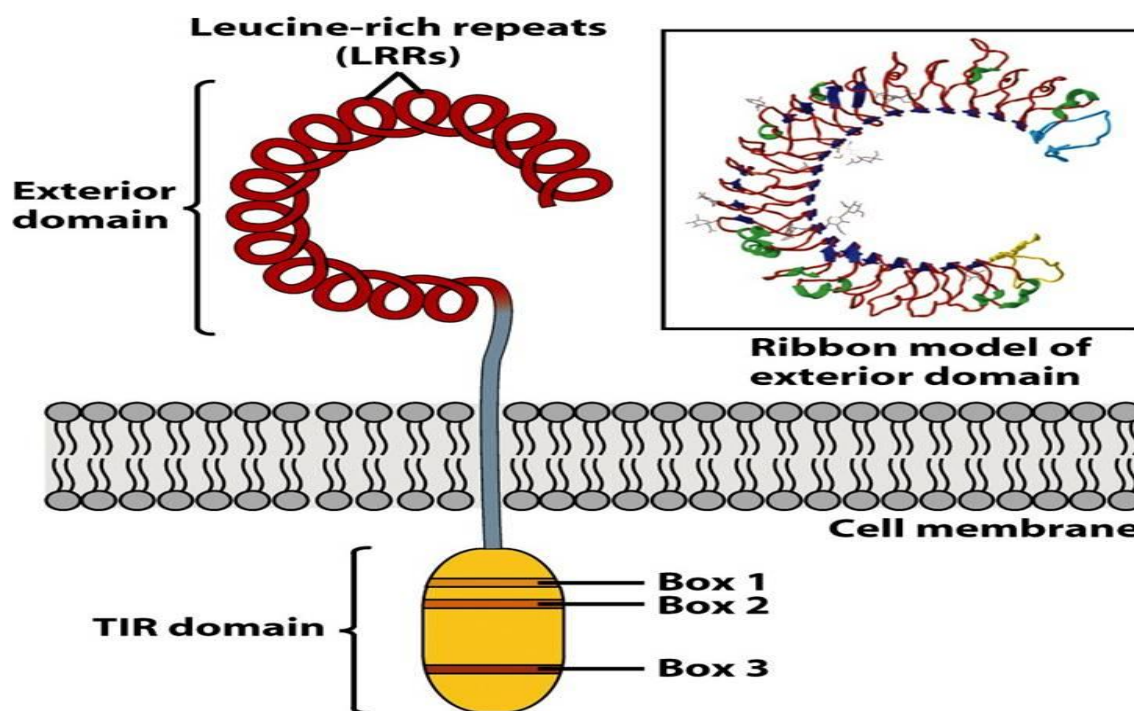
ονομάζονται μοριακά πρότυπα των παθογόνων (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Τα PAMPs είναι σταθερές δομές απολύτως απαραίτητες για τη λοιμογόνο ισχύ των παθογόνων. Επίσης, τα κύτταρα αναγνωρίζουν μόρια «σήματα κινδύνου» (danger-associated molecular patterns, DAMPs), όπως τις πρωτεΐνες θερμικού shock και κλάσματα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, που παράγονται από τα κύτταρα του ξενιστή ως απάντηση στη λοίμωξη. Η αναγνώριση των PAMPs και των DAMPs από τα κύτταρα γίνεται με τη μεσολάβηση μεμβρανικών ή ενδοκυττάριαων πρωτεϊνικών υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors, PRRs). Το αποτέλεσμα της προσκόλλησης βακτηρίων σε αυτούς τους υποδοχείς πυροδοτεί μια αντίδραση στα μακροφάγα που καταλήγει στην εγκύστωση και τη φαγοκυττάρωση των βακτηρίων. Επιπλέον, επάγεται η έκκριση κυτοκινών και άλλων χημικών μεταβιβαστών από τα μακροφάγα [180-182].

Ένας από τους πιο αντιπροσωπευτικούς υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων είναι οι TLRs. Ο Toll υποδοχέας αρχικά αναγνωρίστηκε τη δεκαετία του 80' στη *Drosophila* ως ένας απαραίτητος υποδοχέας για τη ρύθμιση της πολικότητας του προσθιοπίσθιου άξονα στο πρώιμο έμβρυο εντόμων. Το 1966, ο Hoffmann και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ο υποδοχέας Toll ήταν ικανός να επάγει τη φυσική ανοσία της μύγας έναντι στους μύκητες [183]. Στη συνέχεια ομόλογα του Toll υποδοχέα αναγνωρίστηκαν στα θηλαστικά το ένα μετά το άλλο και προσδιορίστηκαν ως TLRs [182].

Οι TLRs είναι μια οικογένεια διαμεμβρανικών υποδοχέων που αναγνωρίζουν μεγάλο φάσμα συνδετών στην κυτταρική επιφάνεια και στα ενδοσώματα. Η αναγνώριση των συνδετών από τους TLRs επάγει τη στρατολόγηση διαφορετικών κυτταροπλασματικών προσαρμογέων και ξεκινά τις πορείες σηματοδότησης οι οποίες τελικά οδηγούν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως οι NF- κ B, IRF (Interferon regulatory factor) 1/3/5/7 και AP-1 (Activator protein-1). Αυτοί οι παράγοντες εμπλέκονται στην έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών, χυμοκινών, ιντερφερονών τύπου I [180,181]. Η οικογένεια των υποδοχέων TLRs θεωρείται ένα από τα πιο αρχέγονα συστατικά του φυσικού ανοσοποιητικού συστήματος των θηλαστικών και περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό υποδοχέων που συνεχώς αυξάνεται. Μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί 13 διαφορετικοί TLRs από τους οποίους οι 10 είναι λειτουργικοί στον άνθρωπο και οι 12 στα ποντίκια. Πιο συγκεκριμένα, οι TLR1-TLR9 είναι κοινοί και στα 2 είδη, ενώ ο TLR10 δεν είναι λειτουργικός στα ποντίκια λόγω μιας παρεμβολής ενός ρετροϊού και οι TLR11, TLR12 και TLR13 έχουν χαθεί από το ανθρώπινο γονιδίωμα. Μελέτες σε ποντίκια-ελλειμματικάγια κάθε TLR έδειξαν ότι ο κάθε υποδοχέας έχει συγκεκριμένη λειτουργία από άποψη αναγνώρισης των PAMPs και των ανοσολογικών απαντήσεων [184]. Τα PAMPs που αναγνωρίζονται από τους TLRs, προέρχονται από μια ευρεία κατηγορία παθογόνων μικροοργανισμών όπως βακτήρια, ιοί, παράσιτα και μύκητες. Η αναγνώριση των PAMPs από τους TLRs λαμβάνει χώρα σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα όπως το κυτταρόπλασμα, ενδοσώματα, λυσοσωμάτια και τα ενδολυσωσώματα. Οι TLRs εκτός του ότι αποτελούν κύριοι ρυθμιστές της φυσικής ανοσίας, είναι επίσης υπεύθυνοι για την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, το οποίο είναι υπεύθυνο και απαραίτητο για την έναρξη της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης [180].

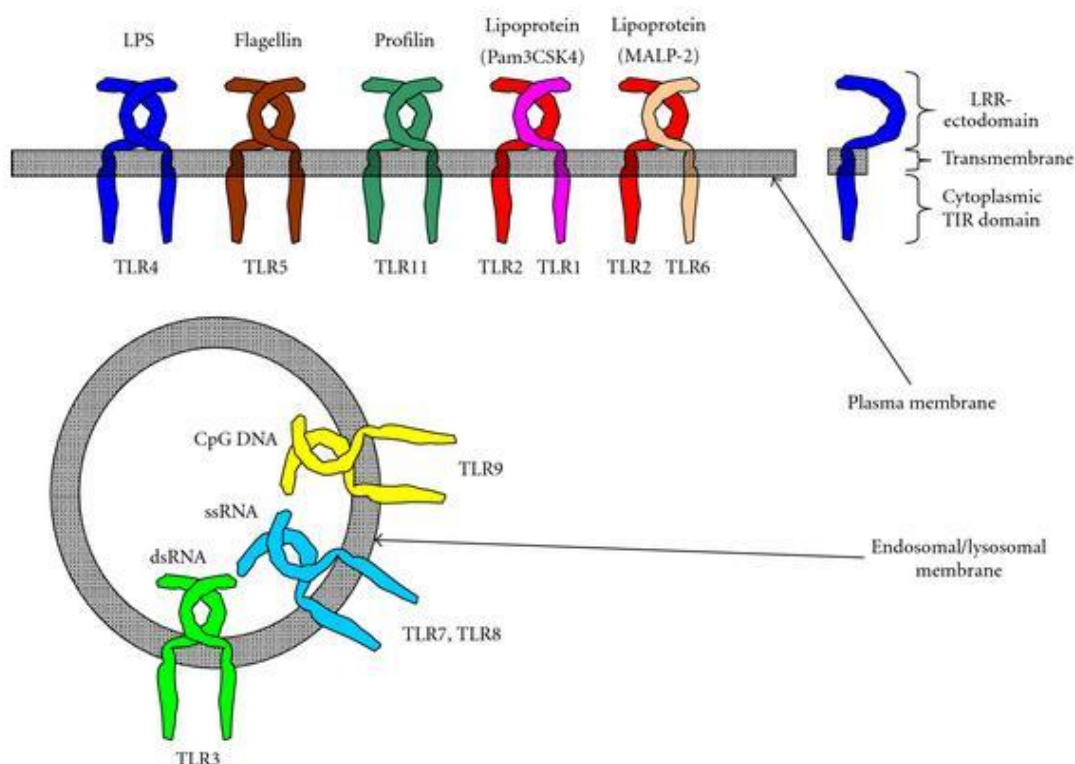
4.3. Δομή και εξωγενείς συνδέτες (ligands) των TLRs

Οι υποδοχείς TLRs είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες τύπου I και έχουν τρι-σπονδυλωτή δομή. Η εξωκυττάρια N-τελική περιοχή αποτελείται από 16-28 επαναλήψεις λευκίνης (leucine-rich repeats - LRRs) και κάθε LRR αποτελείται από 20-30 αμινοξέα με το επαναλαμβανόμενο μοτίβο 'LxxLxLxxN'. Η ενδοκυττάρια C-τελική περιοχή είναι γνωστή ως Toll/IL-1 receptor (TIR) περιοχή, η οποία εμφανίζει υψηλή ομοιότητα με αυτή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 (IL-1). Ο TIR τομέας χαρακτηρίζεται από την παρουσία τριών περιοχών υψηλής ομοιότητας, γνωστές ως κουτιά 1, 2 και 3 οι οποίες είναι ζωτικής σημασίας για τη σηματοδότηση (signaling). Παρά την ομοιότητα των κυτταροπλασματικών περιοχών αυτών των TLRs και IL-1R, η εξωκυττάρια περιοχή τους διαφέρει σημαντικά. Οι TLRs περιλαμβάνουν διαδοχικές επαναλήψεις περιοχών πλούσιες σε λευκίνη (LRR), ενώ η IL-1Rs περιέχει τρεις παρόμοιες με ανοσοσφαιρίνες περιοχές (Immunoglobulin-like domain). Οι δυο περιοχές συνδέονται μεταξύ τους με μια απλή διαμεμβρανική έλικα [180,181] (εικόνα 2).



Εικόνα 2. Η δομή των υποδοχέων τύπου Toll3

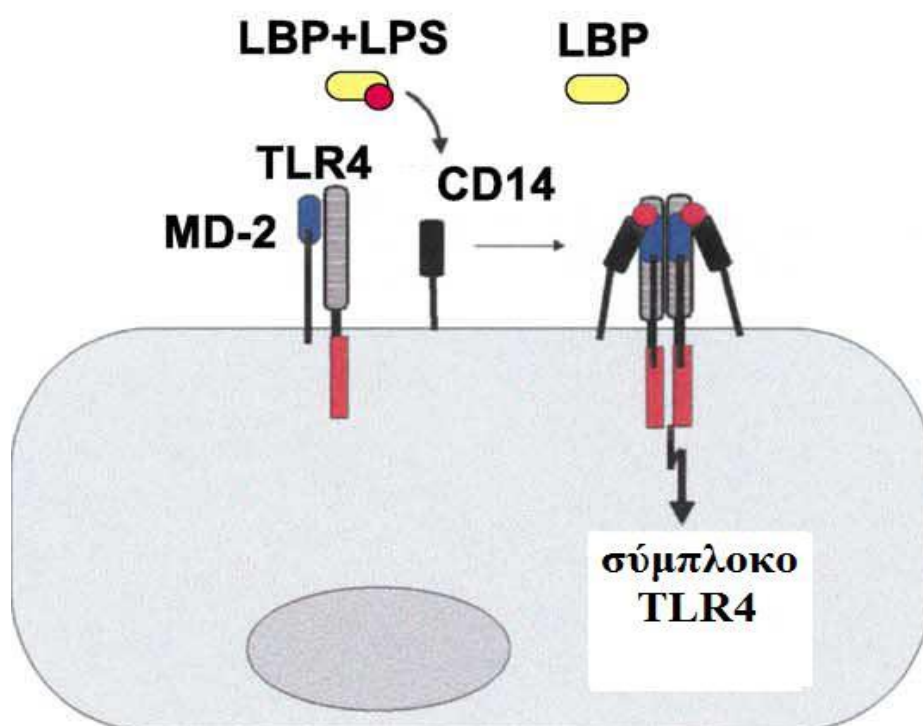
Οι TLRs χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες βάσει της κυτταρικής τους εντόπισης και ανάλογα με τους PAMP συνδέτες. Η μία ομάδα αποτελείται από τους TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 και TLR11, οι οποίοι εκφράζονται στις κυτταρικές επιφάνειες και αναγνωρίζουν κυρίως μικροβιακά κυτταρικά συστατικά όπως λιπίδια, λιποπρωτεΐνες και πρωτεΐνες. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τους TLR3, TLR7, TLR8 και TLR9 που εκφράζονται αποκλειστικά σε ενδοκυττάρια κυστίδια όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα ενδοσώματα, λυσοσώματα και ενδολυσοσώματα, και αναγνωρίζουν μικροβιακά νουκλεϊκά οξέα [180] (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της εντόπισης των διαφόρων τύπων TLRs στα κυτταρικά διαμερίσματα

Ο TLR4, θεμελιώδες μέλος της οικογένειας των TLRs, αναγνωρίζει τον βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (lipopolisaccharide, LPS), ένα συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων που προκαλεί σηπτικό σοκ. Ο TLR4 δημιουργεί ένα σύμπλοκο με την πρωτεΐνη MD2 στην κυτταρική επιφάνεια και μαζί λειτουργούν ως το κύριο συστατικό σύνδεσης του LPS. Πέντε από τις έξι αλυσίδες λιπιδίων του LPS συνδέεται με την πρωτεΐνη MD2 ενώ η έκτη αλυσίδα με τον TLR4. Η δημιουργία ενός πολυμερούς υποδοχέα αποτελούμενο από δύο αντίγραφα του

συμπλόκου TLR4-MD2-LPS ξεκινάει τη μετάδοση του σήματος με τη στρατολόγηση ενδοκυττάρων μορίων προσαρμογείς. Επιπλέον πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη που συνδέει τον LPS (LPS-binding protein, LBP) και ο CD14 εμπλέκονται επίσης στην σύνδεση του LPS. Η LBP είναι μια διαλύτη πρωτεΐνη πλάσματος που συνδέεται με τον LPS και ο CD14 μια γλυκοζυλοφωσφατιδυλο-ινοσιτολ (GPI) υψηλής συγγένειας μεμβρανική πρωτεΐνη που συνδέεται με το LBP και παραδίδει τον LPS-LBP στο σύμπλοκο TLR4-MD2. Συνεπώς, το σύμπλοκο του LPS υποδοχέα είναι ένα σύμπλοκο υπομονάδων στην εξωκυττάρια περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης. Διαστρωματικές μελέτες έδειξαν ότι ο LPS αλληλεπιδρά και με τα τρία συστατικά του TLR4/MD-2/CD14 συμπλόκου (Εικόνα 4) [185].



Εικόνα 4. Το σύμπλοκο του LPS-υποδοχέα του διμερούς TLR4/MD-2 με το CD14 και τον LPS

Ο TLR2 εμπλέκεται στη αναγνώριση ενός ευρέως φάσματος PAMPs προερχόμενο από βακτήρια, μύκητες, παράσιτα και ιούς. Περιλαμβάνουν πολυπεπτίδια από βακτήρια, πεπτιδογλυκάνη και λιποτεχοϊκό οξύ από Gram-θετικά βακτήρια, λιποαραβινομαννάνη από μυκοβακτήρια, ζυμοσάνη από μύκητες και αιμοσυγκολλητίνες από τον ιό της ιλαράς. Ο TLR2 γενικά δημιουργεί ετεροδιμερή με τους TLR1 ή TLR6 υποδοχείς. Ειδικά το TLR1-TLR2 ετεροδιμερές αναγνωρίζει τα τριακυλιωμένα λιποπεπτίδια από τα Gram- αρνητικά βακτήρια και το μυκόπλασμα, ενώ το TLR2-TLR6 ετεροδιμερές αναγνωρίζει τα διακυλιωμένα λιποπεπτίδια από τα Gram-θετικά βακτήρια. Επιπροσθέτως, ο TLR2 έχει την ικανότητα να ενεργεί μαζί με άλλους συν-υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια, το οποίο βοηθάει την αναγνώριση

των PAMPs. Αυτά περιλαμβάνουν το CD36, το οποίο ενεργεί μαζί με το ετεροδιμερές TLR2-TLR6 και μεσολαβεί στην αναγνώριση των διακυλιωμένων λιποπεπτιδίων [186]. Παρόλο που υπήρχε η άποψη ότι οι TLR2 επάγουν κυρίως την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και όχι την τύπου 1 ιντερφερόνη από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, εντούτοις μπορεί να ενεργοποιεί την παραγωγή τύπου 1 ιντερφερόνης από φλεγμονώδη μονοκύτταρα σε απάντηση σε λοιμώξεις με ιό δαμαλίτιδας, που δηλώνει κυτταρικού τύπου ειδικό ρόλο για τον TLR2 σε αντιϊκές απαντήσεις [187].

Ο TLR5 είναι υποδοχέας της φλαγγελίνης, ένα πρωτεϊνικό συστατικό των βακτηριακών εκφύσεων. Ο TLR11 πιστεύεται ότι αναγνωρίζει τα ουροπαθογενετικά βακτηριακά συστατικά, επειδή τα TLR11-ελαττωματικά ποντίκια είναι επιρρεπή σε λοιμώξεις με αυτά τα βακτήρια [180].

Οι ενδοκυττάριοι TLRs αναγνωρίζουν κυρίως νουκλεϊκά οξέα και τα παράγωγά τους. Ο TLR3 αναγνωρίζει ένα συνθετικό ανάλογο της διπλής έλικας RNA (dsRNA), το οποίο μιμείται ιϊκή λοίμωξη και επάγει αντιϊκή ανοσολογική απάντηση, προωθώντας την παραγωγή τόσο της τύπου 1 ιντερφερόνης όσο και των φλεγμονωδών κυτοκινών και αποδεικνύοντας ότι ο TLR3 παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη των ιϊκών λοιμώξεων. Πράγματι, τα TLR3-ελαττωματικά ποντίκια είναι επιρρεπή σε θανατηφόρες λοιμώξεις από κυτταρομεγαλοϊό, ενώ η έλλειψη του TLR3 στον άνθρωπο συνδέεται με ευαισθησία σε λοιμώξεις έρπητα ζωστήρα τύπου 1 [188]. Ο TLR7 αναγνωρίζει τον μονής έλικας RNA (single-stranded RNA, ssRNA) των ιών όπως ο ιός της φυσαλιδώδους στοματίτιδας, ιός της γρίπης A, ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας [189]. Τέλος, ο TLR9 αναγνωρίζει DNA βακτηρίων που περιέχουν μοτίβα με μη-μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια κυτοσίνης γουανοσίνης (CpG). Συνθετικά CpG λειτουργούν ως συνδέτες του TLR9 και άμεσα ενεργοποιούν δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και B κύτταρα [190]. Στον πίνακα 6 φαίνονται αναλυτικά οι TLRs με τους αντίστοιχους συνδέτες και οι επαγόμενες κυτοκίνες.

Πίνακας 6. TLRs και εξωγενείς συνδέτες

TLR	Τοποθέτηση του TLR	PAMPS	Επαγόμενες κυτοκίνες
TLR1/2	Κυτταρική μεμβράνη	Τριακυλ- λιποπεπτίδια (βακτήρια και μυκοβακτήρια)	Φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-6 κλπ.)
TLR2	Κυτταρική μεμβράνη	Πεπτιδογλυκάνη (Gram-θετικά βακτήρια) Λιποτειχοϊκό οξύ (Gram-θετικά βακτήρια) Λιποπρωτεΐνες/λιποπεπτίδια (παθογόνα) Λιποαραβινομαννάνη (μυκοβακτήρια) Άτυποι LPS (βακτήρια), RSV (ιός) Φωσφολιπομαννάνη (μύκητας) Αιμοσυγκολλητίνη (ιός) Ζυμοσάνη (μύκητες)	Φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-6 κλπ.)
TLR3	Ενδόσωμα	dsRNA και ssRNA (ιοί)	Φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-6 κλπ.), IFNs τύπου 1
TLR4	Κυτταρική μεμβράνη	LPS (Gram-αρνητικά βακτήρια) Μαννάνη (μύκητας) Γλυκοϊνοσιτολικά φωσφολιπίδια (πρωτόζωα) RSV και MMTV (ιοί)	Φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-6 κλπ.), IFNs τύπου 1
TLR5	Κυτταρική μεμβράνη	Φλαγγελίνη (βακτήρια)	Φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-6 κλπ.)
TLR6/2	Κυτταρική μεμβράνη	Διακυλολιποπεπτίδια (βακτήρια) Λιποτειχοϊκό οξύ (Gram-θετικά βακτήρια) Ζυμοσάνη (μύκητες)	Φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-6 κλπ.)
TLR7	Ενδόσωμα	ssRNA (ιοί)	Φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-6 κλπ.), IFNs τύπου 1
TLR8	Ενδόσωμα	ssRNA (ιοί)	Φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-6 κλπ.), IFNs τύπου 1
TLR9	Ενδόσωμα	dsDNA (ιοί) CpGDNA (βακτήρια, πρωτόζωα, ιοί) hemozoin (πρωτόζωα)	Φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-6 κλπ.), IFNs τύπου 1
TLR11	Κυτταρική μεμβράνη	Συστατικά ουροπαθογόνων βακτηρίων profiling-likemolecule (πρωτόζωα)	Φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF- α , IL-6 κλπ.)

4.4. Ενδογενείς συνδέτες για τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς TLRs

Εκτός από τα προαναφερθέντα εξωγενή μικροβιακά συστατικά, τα οποία αποτελούν αναγνωρισμένους συνδέτες των TLRs, υπάρχουν όλο και περισσότερα δεδομένα ότι οι TLRs μπορούν να αναγνωρίσουν ενδογενή μόρια του ίδιου του οργανισμού, τα οποία, όπως ειπώθηκε αναφέρονται ως «σήματα κίνδυνου» τα DAMPs ενεργοποιώντας φλεγμονώδεις απαντήσεις. Οι περισσότερες από αυτές παράγονται ως αποτέλεσμα του κυτταρικού θανάτου και κυτταρικής βλάβης ή από κύτταρα όγκου. Περιλαμβάνουν προϊόντα αποικοδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock protein, (Hsp)) και υψηλής κινητικότητας ομάδας 1 πρωτεΐνες (high mobility group protein B-1, (HMGB-1)) που δρουν ως διεγέρτες των κυτταρικών TLRs. Ως αποτέλεσμα της βλάβης ή της φλεγμονής, τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας διασπώνται από κυτταρικές πρωτεάσες και απελευθερώνονται έξω από τα κύτταρα. Μερικά από αυτά τα συστατικά που απελευθερώνονται -όπως το ινωδογόνο, υαλουρονικό οξύ, φμπρονεκτίνη, επιφανειοδραστική πρωτεΐνη Α (surfactant protein A)- ενεργοποιούν τους TLR2 και TLR4. Επίσης, η HMGB1, μια πυρηνική μη ιστονική πρωτεΐνη που απελευθερώνεται από νεκρωτικά κύτταρα ή κατά τη διάρκεια φλεγμονής, είναι ένας προφλεγμονώδης μεσολαβητής τους σηπτικού σοκ και των μοντέλων ισχαιμικής επαναιμάτωσης που λειτουργεί ως συνδέτης για τους TLR2, TLR4 και TLR9. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ όπως Hsp60, Hsp70, Hsp22 και gp96, ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα ώστε να επάγουν προφλεγμονώδεις μεσολαβητές μέσω των TLR2 και TLR4 [180]. Έτσι λοιπόν για να δημιουργηθεί μια ανοσιακή απάντηση από τον οργανισμό απαιτούνται πέρα από την ύπαρξη των PAMPs, επιπλέον «ερεθίσματα κινδύνου» που υποδηλώνουν ιστικό τραυματισμό του ίδιου του ξενιστή. Τα ανωτέρω υποδηλώνουν ότι το ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιείται όχι μόνο επί λοιμώξεων αλλά και σε ασθένειες οι οποίες παραδοσιακά θεωρούνται μη φλεγμονώδεις, όπως η ΔΝ, η υπερτασική νεφροσκλήρυνση και η πολυκυστική νόσος των νεφρών [191].

4.5. Σηματοδότηση μέσω του TLR (TLR signaling)

Η αναγνώριση και η σύνδεση ενός από τους προαναφερθέντες συνδέτες στον αντίστοιχο TLR υποδοχέα, αποτελεί το πρώτο βήμα που πυροδοτεί την έναρξη της λειτουργίας των TLR. Έτσι, αμέσως μετά τη σύζευξη συνδέτη-TLR επιστρατεύονται ένα ή περισσότερα μόρια προσαρμογείς (adaptor molecules) τα οποία μεταδίδουν σήμα ενεργοποίησης του αντίστοιχου TLR μέσω αλληλεπίδρασης με τον ενδοκυττάριο τομέα ομολογίας TIR. Τελικός σκοπός αυτής της μετάδοσης του σήματος ενεργοποίησης του TLR, είναι ο έλεγχος της φυσικής ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή μέσω της διέγερσης ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων και επαγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών [180].

Ορισμένες σηματοδοτικές οδοί είναι κοινές για όλους τους TLRs, ωστόσο, υπάρχουν και κάποιες πιο ειδικές για ορισμένους TLRs. Η ενεργοποίηση της κοινής ή της πιο ειδικής οδού σηματοδότησης, εξαρτάται κυρίως από το πιο μόριο προσαρμογής είναι κάθε φορά διαθέσιμο προς αλληλεπίδραση με το ενδοκυττάριο τμήμα του TIR.

Έχουν αναγνωρισθεί 4 ενδοκυτταροπλασματικοί TIR-προσαρμοστές που εμπλέκονται στην πορεία σηματοδότησης των TLRs: α) ο MyD88, παράγοντας μυελοειδούς διαφοροποίησης 88 (myeloid differentiation factor 88), β) ο TRIF, παράγοντας που περιέχει την περιοχή TIR και επάγει την IFN-β (TIR domain-containing adaptor inducing, IFN-β), γ) ο TIRAP, πρωτεΐνη προσαρμοστής που περιέχει την περιοχή TIR (TIR domain-containing adaptor protein) που δομικά σχετίζεται με τον παράγοντα MyD88 και δ) ο TRAM, το μόριο του προσαρμοστή που σχετίζεται με τον TRIF (TRIF-related adaptor molecule). Οι οδοί σηματοδότησης των TLRs μπορούν να ταξινομηθούν σε MyD88-εξαρτώμενους οδούς που οδηγούν στην επαγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και είτε σε MyD88-ανεξάρτητους οδούς οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την επαγωγή τύπου 1 ιντερφερόνης και φλεγμονωδών κυτοκινών [181,192].

α) MyD88-εξαρτώμενη πορεία

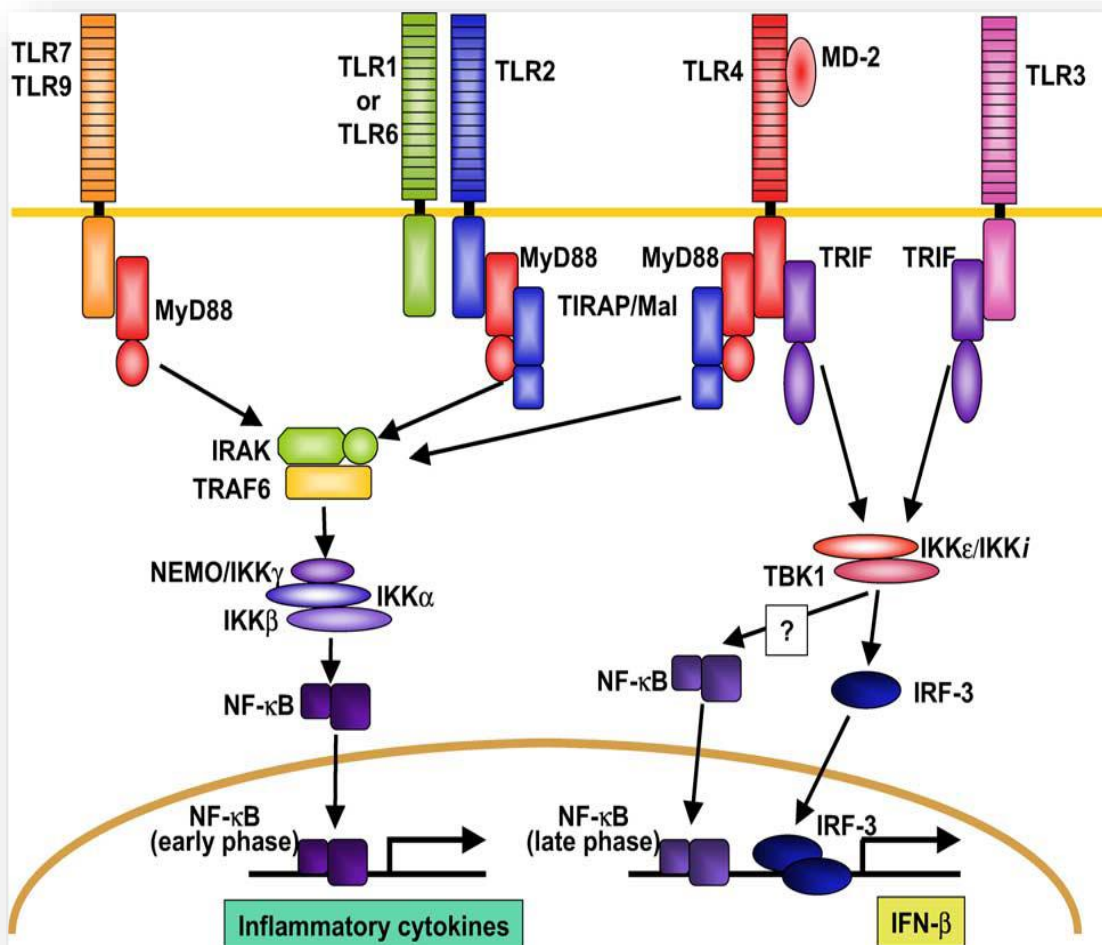
Το μόριο προσαρμογής MyD88, το πρώτο μέλος της TIR οικογένειας που ταυτοποιήθηκε, συζευγνύεται με όλους τους TLRs εκτός από τον TLR3. Μετά την ενεργοποίηση του μορίου MyD88 συρρέουν στο σύμπλεγμα του υποδοχέα TIR οι κινάσες IRAK1 και IRAK4 (IL-1 receptor-associated kinases 1 και 4) καθώς και ο παράγοντας TRAF-6 (tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor-6). Στη συνέχεια το παραπάνω σύμπλεγμα αλληλοεπιδρά με ένα άλλο σύμπλεγμα μορίων που αποτελείται από την κινάση TAK1 (transforming growth factor-β-activated kinase -1) και τις πρωτεΐνες TAB-1,-2,-3 (TAK-binding proteins). Ακολούθως η TAK-1 πυροδοτεί το ένζυμο IKK(IκB kinase), γεγονός που οδηγεί στην μετάθεση του πυρηνικού παράγοντα NF-κβ εντός του πυρήνα του κυττάρου και στην επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων που παράγουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες ενεργοποιώντας μια φλεγμονώδη απάντηση [181,192].

Β) MyD88-ανεξάρτητη πορεία

Σε αυτές τις οδούς σηματοδότησης δεν παρατηρείται συμμετοχής του μορίου MyD88, αλλά η μετάδοση σήματος για την ενεργοποίηση του TLR γίνεται μέσω των πρωτεϊνών προσαρμογής TRIF, TIRAP και TRAM. Αντιθέτως ο TRIF χρησιμοποιείται από τον TLR3 και TLR4 και επάγει εναλλακτικές οδούς οι οποίες οδηγούν στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων IRF3 και NF-κβ και στην επακόλουθη επαγωγή τύπου 1 ιντερφερόνης και φλεγμονωδών κυτοκινών. Οι TRAM και TIRAP λειτουργούν ως επιλεγμένοι υποδοχείς που στρατολογούν τον TRIF στον TLR4 και τον MyD88 στους TLR2 και TLR4, αντίστοιχα. Επομένως, ο TLR4 είναι ο μόνος από τους TLRs ο οποίος χρησιμοποιεί και τους τέσσερεις υποδοχείς και ενεργοποιεί και τις δύο οδούς [181,192].

Το ποιο από τα περιγραφόμενα μονοπάτια ενεργοποιείται κάθε φορά φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του κυττάρου. Για παράδειγμα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα η σηματοδότηση μέσω TLR4 διενεργείται αποκλειστικά από την MyD88-εξαρτώμενη οδό γιατί τα κύτταρα αυτά δεν διαθέτουν το μόριο προσαρμογής

TRAM [182]. Αυτή η ειδική ανά κύτταρο σηματοδότηση των TLRs επιτρέπει τη διακριτή απόκριση κάθε κυτταρικού πληθυσμού σε διάφορα μικροβιακά αντιγόνα. Επίσης είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό ότι, ένα σηματοδοτικό TLR μονοπάτι είναι σημαντικό για την προστασία έναντι των λοιμώξεων, ωστόσο η υπερβολική σηματοδότηση μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοσα νοσήματα, αλλεργίες ή αθηροσκλήρωση. Είναι λοιπόν πρωταρχικής σημασίας να καταλάβουμε πως μπορεί να ελεγχθεί η σηματοδότηση των TLRs. Στην εικόνα 5 απεικονίζονται οι πολύπλοκοι οδοί σηματοδότησης των TLRs και τα μόρια προσαρμογείς.

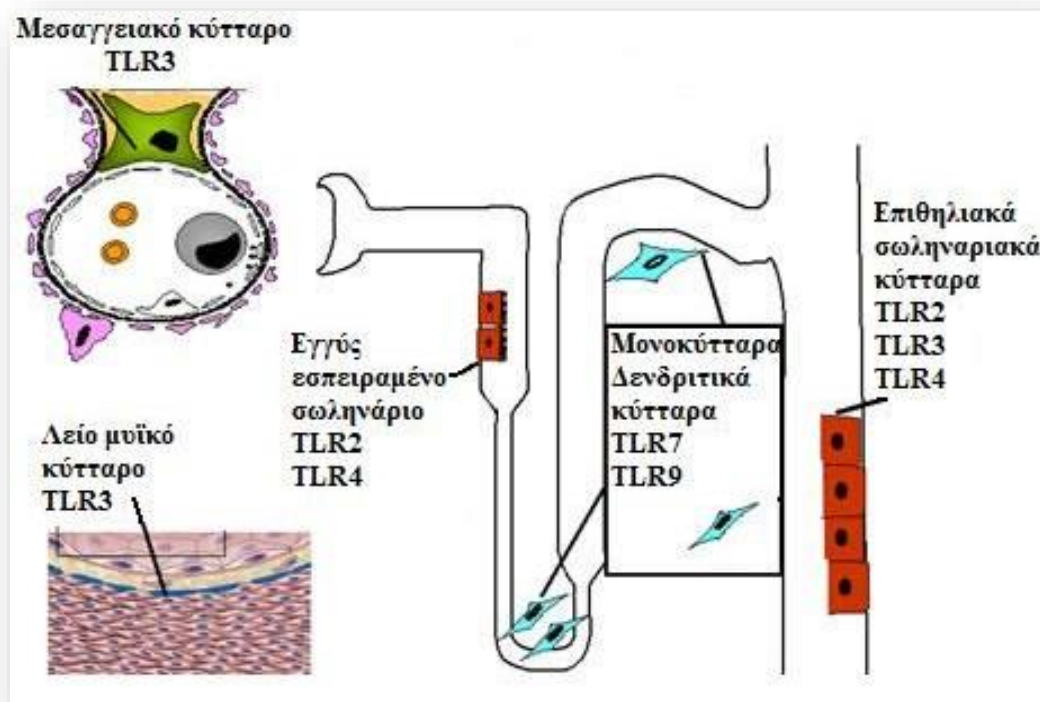


Εικόνα 5. Οδοί σηματοδότησης των TLRs

Κεφάλαιο 5. Δυνητικοί ρόλοι των TLRs στις νεφρικές νόσους

5.1. Ρόλος των TLRs στις Νεφρικές Νόσους

Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι η υπερενεργοποίηση των TLRs μπορεί να συμβάλει στην παθογένεια πολλών νεφρικών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου της ισχαιμικής νεφρικής βλάβης, απόρριψης μωσχεύματος, οξείας νεφρικής βλάβης, νεφρίτιδα και λοιμώξεις ουροποιητικού [193]. Οι TLRs μπορούν να συμβάλουν στην νεφρική βλάβη μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Η ενεργοποίησή τους σε τοπικό επίπεδο γίνεται από λοιμογόνους παράγοντες, από TLR αγωνιστές που εναποτίθενται στο νεφρό (πχ ανοσοσυμπλέγματα) ή η δημιουργία ενδογενών αγωνιστών στο σημείο της βλάβης. Η συστηματική ενεργοποίηση των TLRs μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων, όπως ο ρευματοειδής παράγοντας ή αυτοαντισώματα του λύκου, τα οποία εναποτίθενται στους νεφρούς. Μπορεί επίσης να παράγει φλεγμονώδεις μεσολαβητές που μπορούν να επηρεάσουν προϋπάρχουσες βλάβες στο νεφρό [194]. Εκτός από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, οι TLRs είναι ευρέως διανεμημένοι σε διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου νεφρικά κύτταρα (μεσαγγειακά, σωληναριακά κύτταρα, ποδοκύτταρα), όπου φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της ανοσίας έναντι των παθογόνων αλλά και την ανάπτυξη διαφόρων νεφρικών παθολογιών. Στην εικόνα 6 φαίνεται η κατανομή των TLRs στο νεφρό.



Εικόνα 6. Έκφραση των TLRs στο νεφρό

5.2. TLRs και λοιμώξεις

Οι εξωγενείς συνδέτες των TLRs μπορούν να έχουν πρόσβαση στον νεφρό ως αποτέλεσμα εισόδου κάποιου παθογόνου μικροοργανισμού, οδηγώντας σε λοιμώξεις ουροποιητικού συστήματος όπως ουρολοιμώξεις, πυελονεφρίτιδες και νεφρικές λοιμώξεις από λεπτοσπείρωση. Από τους TLRs που εκφράζονται στην επιφάνεια των ουροποιητικών κυττάρων, μόνο οι TLR4, TLR5 και TLR11, έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν *in vivo* στην άμυνα ενάντια στις βακτηριακές λοιμώξεις. Πράγματι, πειράματα σε ζώα που δεν μπορούσαν να εκφράσουν τους TLR4, TLR5 και TLR11, έδειξαν ότι αυτά τα ζώα δεν ήταν ικανά να αντιμετωπίσουν τις λοιμώξεις ουροποιητικού [195-197]. Ειδικότερα, ο ρόλος του TLR4 στις βακτηριακές λοιμώξεις στον άνθρωπο έχει επιβεβαιωθεί σε ασθενείς με ασυμπτωματική βακτηριουρία, στους οποίους παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης του TLR4. Η ελαττωμένη κάθαρση των μικροοργανισμών από τον οργανισμό συνδεδεμένη με ελαττωματικό TLR4 είναι πιθανά αποτέλεσμα μιας περιορισμένης τοπικής ανοσολογικής απάντησης κυτοκινών, χυμοκινών και ουδετερόφιλων και μιας μειωμένης ικανότητας του συγκεκριμένου υποδοχέα να διάγει διάφορες αντιμικροβιακές δραστηριότητες στο ουροποιητικό σύστημα [196-198]. Ο TLR5, ο οποίος αναγνωρίζει μια πρωτεΐνη των βακτηρίων την φλατζελίνη, πιθανά διαμορφώνει την ευαισθησία στις λοιμώξεις ουροποιητικού από *E. Coli*, όπως φάνηκε στην έρευνα των Andersen-Nissen et al, όπου τα TLR5-ελλειμματικά ποντίκια ήταν πιο ευάλωτα σε σχέση με τα αντίστοιχα wild-type ποντίκια [197]. Όσον αφορά τον TLR11 δεν είναι λειτουργικός στον άνθρωπο. Οι γνώσεις που έχουμε για την λειτουργία και την ανοσοπαθολογία του, βασίζονται σε πειράματα κυρίως σε ποντίκια. Πράγματι στα ποντίκια ο TLR11, εκφράζεται κυρίως στο νεφρό και το ήπαρ και είναι υπεύθυνος για τη φυσική ανοσία και την προστασία έναντι στις λοιμώξεις από ουροπαθογόνα βακτήρια, όπως η *E.coli* [193].

Ο TLR4 παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία της πυελονεφρίτιδας, της πιο σοβαρής μορφής λοίμωξης του ουροποιητικού η οποία προκαλείται κυρίως από τοξικά ουροπαθογόνα γένη του *E.coli* τα οποία ανέρχονται από το κατώτερο ουροποιητικό σύστημα στο νεφροσωληναριακό σύστημα. Υποδοχείς γλυκολιπιδίων των ουροεπηθηλιακών και νεφρικών σωληναριακών κυττάρων ενώνονται με τα fimbriae του *E.coli*. Αυτή η αλληλεπίδραση ενεργοποιεί τον TLR4 και την επακόλουθη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων και την απελευθέρωση των προφλεγμονωδών κυτοκινών και των αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Η δυσλειτουργία του TLR4 σε ποντίκια πιθανά προδιαθέτει σε χρόνιες, υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του ουροποιητικού. Έρευνες *in vitro*, έδειξαν ότι η απελευθέρωση των κυτοκινών και χυμοκινών, ως απάντηση στο βακτήριο *E.coli*, απαιτεί την παρουσία του TLR4 [199].

Οι TLRs και συγκεκριμένα ο TLR2 παίζει σημαντικό ρόλο στη νεφρική βλάβη από λεπτοσπείρωση. Η λεπτόσπειρα μπορεί να προκαλέσει οξεία διαμεσοσωληναριακή νεφρίτιδα και οξεία νεφρική ανεπάρκεια μέσω της άμεσης εισβολής της στο νεφρό. Επίμονη λοίμωξη με λεπτόσπειρα στο εγγύς σωληνάριο οδηγεί σε χρόνια διαμεσοσωληναριακή βλάβη και ίνωση. Λιποπολυσακχαρίτες, γλυκολιπίδια, και λιποπρωτεΐνες, αυξάνουν την έκφραση του TLR2mRNA στα

ποντίκια με δόσο-εξαρτώμενο και χρόνο-εξαρτώμενο. Έρευνες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του TLR2 από μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης της *Leptospira santarosai* του ορότυπου Shermani, οδηγεί σε έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών που απελευθερώνονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού καθώς και από νεφρικά κύτταρα και συμβάλουν στη νεφρική βλάβη [200]. Αντίθετα ο TLR4 φαίνεται να είναι σημαντικός για την προστασία ενάντια στην οξεία θανατηφόρο λοίμωξη στα ποντίκια. Είναι πιθανό ότι διαφορετικά μέρη της λεπτόσπειρας, ενεργοποιούν διαφορετικούς TLRs και αυτό ενεργοποιεί διαφορετικές ανοσολογικές απαντήσεις, η αλληλεπίδραση των οποίων επηρεάζει την μακροπρόθεσμη έκβαση των ασθενών [201].

5.3. TLRs και οξεία νεφρική ανεπάρκεια

Η ONA συχνά συνδέεται με τη σήψη. Η αναγνώριση των εξωγενών PAMPs από τους TLRs με την επακόλουθη μη ελεγχόμενη ανοσολογική απάντηση φαίνεται να παίζει πρωταρχικό ρόλο στην παθογένεια της σήψης. Η μεγάλη παραγωγή κυτοκινών επάγει τη συστηματική αγγειοδιαστολή και υπόταση οδηγώντας σε σηπτικό σοκ. Ο συνδυασμός συστηματικής υπότασης και η τοπική αγγειοσύσπαση καθώς και η δημιουργία μικροθρόμβων οδηγεί σε οξεία σωληναριακή νέκρωση λόγω ισχαιμίας. Εκτός από τους εξωγενείς PAMPs, η αναγνώριση των ενδογενών DAMPs από τους TLRs, που παράγονται λόγω της ισχαιμικής νεφρικής βλάβης, φαίνεται να εμπλέκονται στην ONA που παρατηρείται στη σήψη. Ο κίνδυνος σηψαιμίας είναι ιδιαίτερα υψηλός αν η ONA επάγεται από ενδοτοξίνες όπως λιποπολυσακχαρίτες (LPS), οι οποίες αποτελούν κύρια συστατικά του κυτταρικού τοίχους των Gram-αρνητικών βακτηρίων [202]. Πειράματα σε ποντίκια έχουν επιβεβαιώσει ότι η έγχυση LPS οδηγεί σε σήψη και ONA. Κυτοκίνες όπως TNF- α και IL-1, πιθανά να είναι πρώιμοι μεσολαβητές της ONA, επειδή απελευθερώνονται στην κυκλοφορία τις πρώτες ώρες μετά την έγχυση του πολυσακχαρίτη [193]. Ο ρόλος του TLR4 στη θνησιμότητα επαγόμενη από LPS επιβεβαιώθηκε σε πειραματικές μελέτες σε C3H/HeJ ποντίκια. Αυτό το στέλεχος των ποντικών παρουσιάζει μια μετάλλαξη του γονιδίου TLR4 που οδηγεί σε ελαττωματική απάντηση στη βακτηριακή ενδοτοξίνη. Πράγματι, όταν κύτταρα μυελού των οστών του στελέχους C3H/HeJ ποντικών μεταφέρθηκαν σε wild type ποντίκια, παρατηρήθηκε μια σχετική προστασία έναντι στη θνησιμότητα από τον LPS. Τα αποτελέσματα της έρευνας υποδεικνύουν ότι η σηματοδότηση μέσω του TLR4 υποδοχέα στα λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητη για τις συστηματικές επιπτώσεις των λιποπολυσακχαριτών. Από την άλλη, η έγχυση LPS σε C3H/HeJ ποντίκια των οποίων οι νεφροί έχουν μεταμοσχευθεί από wild-type ποντίκια, έδειξε μια παροδική ONA. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι οι ενδονεφρικοί TLRs έχουν επίσης ένα ρόλο στην ONA επαγόμενη από LPS, αν και ο ρόλος τους είναι λιγότερος σημαντικός από αυτόν των TLRs που εκφράζονται στα λευκοκύτταρα [203].

5.4. TLRs και σπειραματονεφρίτιδες

Οι συνδέτες των TLRs είναι πιθανόν να συμβάλουν στην ανάπτυξη των σπειραματονεφρίτιδων μέσω δύο οδών: επάγοντας μια φλεγμονώδη απάντηση μέσω λεμφοκυττάρων και ενδογενών κυττάρων (επάγουν την φυσική ανοσολογική απάντηση), ή προκαλώντας την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και την ενεργοποίηση των T κυττάρων (επάγουν την ειδική ανοσολογική απάντηση) [193].

Ο TLR4 εκφράζεται τόσο στα ενδογενή νεφρικά κύτταρα όσο στα λεμφοκύτταρα, αλλά η δραστηριότητα του TLR4 εκφρασμένη στα λεμφοκύτταρα συνδέεται περισσότερο με τη σοβαρότητα της νεφρικής βλάβης, όπως αυτή αξιολογείται με βάση την αλβουμινουρία. Μια μελέτη σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα, έδειξε ότι ο Pam3CSK4, ένας συνθετικός συνδέτης του TLR2 που μιμείται τη βακτηριακή λιποπρωτεΐνη, επιδείνωσε τη σοβαρότητα της νόσου μέσω ενός TLR2-εξαρτώμενου μηχανισμού, ενώ η χρήση ελλειμματικών ποντικών - σε TLR2, έδειξε ότι η επιδείνωση της νόσου γίνεται μέσω ενός TLR2-εξαρτώμενου μηχανισμού [204].

Η εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων, τα οποία ενεργοποιούν νεφρικά κύτταρα ώστε να παράγουν προφλεγμονώδεις παράγοντες, μπορούν να οδηγήσουν σε σπειραματονεφρίτιδες από ανοσοσυμπλέγματα. Η πειραματική βλάβη επιδεινώνεται περαιτέρω από επιπρόσθετους προφλεγμονώδεις παράγοντες που παράγονται κατά τη διάρκεια της επακόλουθης στρατολόγησης των μακροφάγων. Στη νεφρίτιδα λύκου για παράδειγμα, η διήθηση των νεφρών από λεμφοκύτταρα και η ενεργοποίηση της απελευθέρωσης των κυτοκινών είναι συνέπεια της ανοσολογικής βλάβης επαγόμενης από αυτοαντισώματα, εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων και ενεργοποίηση του συμπληρώματος [193]. Αν και ο ρόλος TLRs στην παθογένεια του συστηματικού ερυθματώδους λύκου (ΣΕΛ) έχει μελετηθεί ευρέως σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, τα αποτελέσματα εντούτοις είναι αμφιλεγόμενα. Σε ποντίκια γενετικά προδιαθετημένα για ΣΕΛ, η ενεργοποίηση του TLR9 συνδέθηκε με προστασία έναντι στη νεφρίτιδα ως αποτέλεσμα της τροποποιημένης ενεργοποίησης των ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων [205]. Παρόλα αυτά ο ενδογενής TLR9 προάγει την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι του δίκλωνου (double-stranded) DNA (dsDNA) σε ποντίκια γενετικά προδιαθετημένα για ΣΕΛ και είναι απαραίτητος για την παθογένεια της νόσου, μέσω ενεργοποίησης των B κυττάρων [206]. Επιπλέον, η ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης του TLR9 στους νεφρικό ιστό ανέδειξε ενισχυμένη πειραματική έκφραση στους ασθενείς με διάχυτη υπερπλαστική που συνδέθηκε με υψηλό δείκτη ενεργότητας της νόσου [205]. Επίσης, η έλλειψη του TLR7 σε ποντίκια γενετικά προδιαθετημένα με ΣΕΛ, συνδέεται με μειωμένη δραστηριοποίηση των δενδριτικών κυττάρων και μειωμένη αυτοάνοση βλάβη στους νεφρούς και τους πνεύμονες [207], ενώ η υπερέκφρασή του επάγει την ανάπτυξη του φαινότυπου του λύκου [208].

Ιογενείς αγωνιστές των TLRs μπορούν επίσης να συμβάλουν στην παθογένεια των σπειραματονεφρίτιδων από ανοσοσυμπλέγματα. Οι TLRs που αναγνωρίζουν νουκλεϊκά οξέα μπορεί να επιδεινώσουν τις συγκεκριμένες σπειραματονεφρίτιδες

μέσω τριών μηχανισμών. Αρχικά το ιϊκό double-stranded RNA ενεργοποιεί τον TLR3 ώστε να ενισχύσει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυττάρων από τα πειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Ο TLR7 μπορεί να ενεργοποιήσει Β κύτταρα οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή αυτοαντισωμάτων και πειραματική εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων. Τέλος, ο TLR3, TLR7 και ο TLR9 επάγουν τη μετατροπή των δενδριτικών κυττάρων σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και ενεργοποιούν επιλεκτική παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, χυμοκινών και ιντερφερόνων τύπου από τα μακροφάγα του νεφρού [209].

Τέλος, σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (HCV) και σπειραματονεφρίτιδα, παρατηρήθηκε εντόνως αυξημένη έκφραση του TLR3mRNA η οποία συσχετιζόταν με το mRNA των χυμοκινών CCL5 (cc ligand 5 chemokine) και CCL2. Αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι πιθανά η ενεργοποίηση του μεσαγγειακού TLR3 από το ιϊκό RNA (κατά τη διάρκεια της HCV λοίμωξης), συμβάλει στην απελευθέρωση χυμοκινών και κυτοκινών και επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την απόπτωση. Η έκφραση του TLR3 στα νεφρικά κύτταρα πιθανά αποτελεί σύνδεσμο ανάμεσα σε ιογενείς λοιμώξεις και τη πειραματική νόσο. Επίσης έρευνες έχουν δείξει ότι η ταυτόχρονη ενεργοποίηση του TLR3 και TLR7 προκαλεί συνεργική ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων in vitro [210].

5.5. TLRs και απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος

Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση των TLRs μπορεί να ευθύνεται για την απόρριψη του νεφρικού μοσχεύματος μέσω ενεργοποίησης φυσικών και ειδικών ανοσολογικών απαντήσεων. Η ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας μέσω του TLR4 στο νεφρό του δότη καταλήγει σε οξεία απόρριψη μετά την μεταμόσχευση [211-213]. Πιθανά οι ενδογενείς και εξωγενείς συνδέτες ενεργοποιούν τον TLR4 στους πτωματικούς νεφρικούς δότες οδηγώντας σε αύξηση της ανοσολογικής απαντητικότητας του λήπτη προς το νεφρικό δότη. Ο κίνδυνος της οξείας απόρριψης μοσχεύματος μειώνεται σημαντικά στους ασθενείς που λαμβάνουν νεφρικά μοσχεύματα με μη λειτουργικές παραλλαγές του υποδοχέα TLR4. Αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν μειωμένες ανοσολογικές απαντήσεις στους λιποπολυσακχαρίτες και μειωμένες ειδικές απαντήσεις υπεύθυνες για την κυτταρική απόρριψη μοσχεύματος [214]. Επιπλέον, σε μεταμοσχευμένους ασθενείς με χρόνια απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος παρατηρήθηκε αυξημένη TLR4mRNA έκφραση [215]. Έχουν επίσης μελετηθεί και πολυμορφισμοί των TLR4. Έρευνα έδειξε ότι ασθενείς που έλαβαν νεφρικό μόσχευμα από πτωματικούς δότες στους οποίους το γονίδιο TLR4 περιείχε πολυμορφισμούς που συνδέονται με τις μεταλλάξεις Asp299Gly ή Thr399Ile (οι οποίες συνδέονται με μειωμένη φλεγμονώδη απόκριση στις ενδοτοξίνες), παρουσίασαν μικρότερη επίπτωση οξείας απόρριψης σε σχέση με ασθενείς που έλαβαν μόσχευμα από δότες με wild type TLR4 [214]. Επίσης η λειτουργία μοσχεύματος αμέσως μετά τη μεταμόσχευση ήταν σημαντικά καλύτερη στους ασθενείς που έλαβαν μόσχευμα από δότη που έφερε τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις [216].

Εκτός από τον TLR4, και άλλοι TLRs συνδέονται με απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος. Πράγματι, έρευνες έδειξαν ότι η έκφραση του TLR2 σε νεφρικά μοσχεύματα συνδέεται με βελτιωμένη λειτουργία μοσχεύματος δύο χρόνια μετά την μεταμόσχευση, αν και περαιτέρω έρευνες απαιτούνται για να επιβεβαιώσουν αυτή τη υπόθεση [217]. Επίσης μια πρόσφατη έρευνα *in vitro*, έδειξε αυξημένη TLR9mRNA έκφραση σε μεταμοσχευμένους ασθενείς με χρόνια τοξικότητα από κυκλοσπορίνη [215]. Περαιτέρω έρευνες χρειάζονται για να συνδέσουν τους διάφορους τύπους TLRs με τις διαφορετικές αιτίες δυσλειτουργίας μοσχεύματος στους μεταμοσχευμένους ασθενείς.

5.6. TLRs και νεφρική βλάβη εξ' ισχαιμίας και επαναιμάτωσης

Η νεφρική ισχαιμία, η οποία συμβαίνει όταν η παροχή αίματος στο νεφρό είναι ανεπαρκής, είναι συχνή αιτία της οξείας νεφρικής βλάβης, της νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου καθώς επίσης και σημαντικός παράγοντας που συμβάλει στην απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος και την καθυστερημένη λειτουργία του μοσχεύματος [218,219]. Κατά τα αρχικά στάδια της ισχαιμικής νεφρικής βλάβης, φλεγμονώδη κύτταρα εισέρχονται στο νεφρό και προκαλούν βλάβη εξ' ισχαιμίας- επαναιμάτωσης. Η συμβολή του ανοσοποιητικού συστήματος στη συγκεκριμένη νεφρική βλάβη, στην οποία λείπουν οι PAMPs (πχ λοιμογόνοι παράγοντες), υποδεικνύει ένα πιθανό ρόλο των DAMPs αναγνωριζόμενοι από τους TLRs. Όπως προαναφέραμε οι DAMPs παράγονται από την αρχική νέκρωση και απόπτωση τμήματος των νεφρικών σωληναριακών κυττάρων λόγω της ισχαιμικής προσβολής. Αναγνωρίζονται από τοπικούς TLRs και προάγουν φλεγμονή μέσω παραγωγής κυτοκινών και χυμοκινών, και στρατολόγηση ανοσιακών κυττάρων επεκτείνοντας την αρχική νεφρική βλάβη [220].

Από τους TLRs, ο TLR2 φαίνεται να παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο στην οξεία νεφρική βλάβη επαγόμενη από ισχαιμία- επαναιμάτωση. Τα υπάρχοντα δεδομένα πηγάζουν κυρίως από πειραματικές μελέτες. Σε μοντέλο πειραματικής βλάβης εξ' ισχαιμίας- επαναιμάτωσης παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA TLR2 [221]. Μια άλλη έρευνα έδειξε ότι τα μεταλλαγμένα ποντίκια που στερούνται τον υποδοχέα TLR2 (TLR2^{-/-}) και τα ποντίκια που στερούνται την πρωτεΐνη πρωτογενούς απάντησης MyD88 (MyD88^{-/-}) ήταν προστατευμένα από ισχαιμική βλάβη επαγόμενη από απόφραξη της νεφρικής αρτηρίας, με μεγαλύτερη προστασία να εμφανίζουν τα TLR2^{-/-} ποντίκια. Δεδομένου ότι ο TLR2 σηματοδοτεί μέσω της MyD88, τα παραπάνω ευρήματα προτείνουν ένα επιπρόσθετο MyD88-ανεξάρτητο μονοπάτι που μπορεί να συμβάλει στη νεφρική βλάβη εξ' ισχαιμίας-επαναιμάτωσης μέσω του TLR2 [222]. Επιπλέον, αυτός ο υποδοχέας, ο οποίος εκφράζεται στο νεφρικό παρέγχυμα, θεωρείται ότι είναι ο βασικός παράγοντας για την υπερβολική φλεγμονώδη απάντηση σε κατάσταση νεφρικής βλάβης από ισχαιμία-επαναιμάτωση. Αυτή η υπόθεση βασίζεται στο γεγονός ότι στα TLR2-ελλειμματικά ποντίκια η παραγωγή κυτοκινών και χυμοκινών, καθώς και η διήθηση του νεφρικού παρεγχύματος από λεμφοκύτταρα είναι μειωμένες σε σχέση με τα ποντίκια που εκφράζουν κανονικά τον υποδοχέα [223].

Ο TLR4 επίσης εμπλέκεται στη νεφρική βλάβη από ισχαιμία-επαναιμάτωση. Στα ποντίκια η ισχαιμική προσβολή αυξάνει την έκφραση του TLR4. Έρευνες σε TLR4-ελλειμματικά ποντίκια (γενετικά τροποποιημένα ποντίκια) έδειξαν ότι λιγότερα λευκοκύτταρα και μικρότερος αριθμός κυτοκινών διήθησαν τους νεφρούς σε σχέση με τα wild-type ποντίκια [224]. Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να υπονοήσει ότι ο TLR4 έχει προφλεγμονώδη ρόλο. Ανάλογα με τον TLR2, και ο TLR4 θα μπορούσε να σχετίζεται με βλάβη εξ'ισχαιμίας-επαναιμάτωσης αν λάβουμε υπόψιν ότι τα μεταλλαγμένα ποντίκια που στερούνται τον υποδοχέα TLR4 (TLR4^{-/-}) και τα MyD88^{-/-} ποντίκια ήταν προστατευμένα από πειραματική νεφρική βλάβη εξ'ισχαιμίας-επαναιμάτωσης [225].

5.7.TLRs και ΧΝΝΤΣ

Η ΧΝΝΤΣ συνδέεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα κυρίως λόγω καρδιαγγειακής νόσου και λοιμώξεων. Πιθανά αυτό να οφείλεται σε διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος που παρατηρείται σε αυτούς τους ασθενείς. Πράγματι, η ουραιμία χαρακτηρίζεται αφενός από ανοσοκαταστολή η οποία συμβάλλει στην αυξημένη επίπτωση των λοιμώξεων και αφετέρου από ανοσοενεργοποίηση που οδηγεί σε φλεγμονή συμβάλλοντας στα καρδιαγγειακά συμβάματα. Η ουραιμία μειώνει την αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα των δενδριτικών κυττάρων και των μακροφάγων πιθανά μέσω διαταραχή της έκφρασης των TLRs [226]. Υπάρχουν λίγες έρευνες που μελέτησαν την έκφραση των TLR2 και TLR4 σε περιφερικά μονοκύτταρα ασθενών υπό αιμοκάθαρση, με αντικρουόμενα ωστόσο αποτελέσματα. Έτσι λοιπόν, ενώ ο Gollapudi et al, βρήκαν αυξημένη έκφραση των TLR2 και TLR4 στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς [227], αντίθετα μια ιαπωνική έρευνα έδειξε μειωμένη έκφραση του TLR4 [228]. Τα αίτια της διαφοράς αυτής δεν ήταν ξεκάθαρα, ωστόσο αποδόθηκαν στα διαφορετικά χαρακτηριστικά των πληθυσμών της μελέτης και σε διαφορετικές μεθόδους αιμοκάθαρσης. Ανεξάρτητα από τα αποτελέσματα των μελετών, είναι κοινά αποδεκτό ότι η έκφραση των υποδοχέων επηρεάζεται εκτός από την ουραιμία και από τις ενδοτοξίνες που περιέχονται στο διάλυμα αιμοκάθαρσης [226]. Επίσης έχει βρεθεί ότι οι TLR4 εκφράζεται στα περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα. Η διαταραγμένη λοιπόν έκφραση του υποδοχέα σε ασθενείς υπό περιτοναϊκή κάθαρση θα μπορούσε να συμβάλλει στη μειωμένη προστασία ενάντια στις περιτονίτιδες, μια υπόθεση ωστόσο που πρέπει να αποδειχθεί [229].

Ακόμα λιγότερα δεδομένα υπάρχουν για τους ασθενείς με ΧΝΝ που δεν υποβάλλονται σε εξωνεφρική κάθαρση. Ο πρώτος που μελέτησε την έκφραση του TLR4 σε περιφερικά μονοκύτταρα ασθενών με ΧΝΝ σταδίου 3 και 4 ήταν ο Ando et al ο οποίος έδειξε μειωμένη έκφραση του υποδοχέα και ιδιαίτερα στους ασθενείς που είχαν προδιάθεση για λοιμώξεις [230]. Ειδικά για τους ασθενείς με ΔΝ υπάρχουν πρόσφατα λιγοστά δεδομένα από μελέτες σε πειραματόζωα [231] και από μελέτες in vitro [232, 233].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως έγινε κατανοητό τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον σχετικά με την κατανόηση του ρόλου των TLRs στα διάφορα νεφρολογικά νοσήματα. Ωστόσο, με βάσει τα υπάρχοντα δεδομένα, λίγες έρευνες in vivo υπάρχουν που να μελετούν τον ρόλο των TLRs σε ασθενείς με ΧΝΝ που δεν υποβάλλονται σε εξωνεφρική κάθαρση και κυρίως σε ασθενείς με ΔΝ.

Σκοπός της μελέτης μας είναι να κατανοήσουμε τη σημασία και να αξιολογήσουμε την πιθανή συμβολή των TLRs στη συστηματική φλεγμονή της ΧΝΝ και της ΔΝ. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε την μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 και την ενδοκυττάρια παραγωγή των ιντερλευκινών IL-1β και IL-6 μετά από ενεργοποίηση με τον συνδέτη του TLR2 το συνθετικό λιποπεπτίδιο Pam3CSK4, σε ασθενείς με ΧΝΝ με και χωρίς ΔΝ καθώς και σε φυσιολογικά άτομα. Επίσης, στον ίδιο πληθυσμό ασθενών διεξήγαμε την ταυτόχρονη μέτρηση 27 φλεγμονωδών μορίων, όπως κυτοκίνες, χυμοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, με στόχο την καλύτερη κατανόηση της πολυπλοκότητας της έκφρασης των φλεγμονωδών δεικτών στη ΧΝΝ, μια διαδικασία που μπορεί να προσθέσει ένα κομμάτι στο «παζλ» της παθογένεσης της νεφρικής βλάβης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 6. Ασθενείς και μέθοδοι

6.1. Χαρακτηριστικά ασθενών

Μελετήθηκαν 85 ενήλικες μη αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς με ΧΝΝ όλων των σταδίων (1-4) από το Εξωτερικό Ιατρείο της Νεφρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κατά το διάστημα μεταξύ Νοεμβρίου του 2008 και Σεπτεμβρίου 2012. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν ασθενείς ενήλικες, ηλικίας μεγαλύτερη των 40 ετών, με ιστορικό ΧΝΝ σταδίων 1 έως 4, μη αιμοκαθαιρόμενοι. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς που λάμβαναν στατίνη, ή είχαν ιστορικό καρκίνου ή αυτοάνοσου νοσήματος ή είχαν νοσηλεία σε νοσοκομείο το τελευταίο τρίμηνο. Όλοι οι ασθενείς που προσήλθαν στο Εξωτερικό Νεφρολογικό Ιατρείο, υποβλήθηκαν σε λεπτομερή λήψη ατομικού ιστορικού και σε κλινική εξέταση, ενώ καταγράφηκαν τα δημογραφικά τους στοιχεία, οι συνήθειες καπνίσματος και κατανάλωσης αλκοόλ και η φαρμακευτική αγωγή.

Η επίπτωση των πρωτοπαθών νεφρικών νοσημάτων στους ασθενείς φαίνεται στον πίνακα 7

Πρωτοπαθές Νεφρικό Νόσημα	Αριθμός ασθενών	Ποσοστό (%)
Υπερτασική Νεφροσκλήρυνση	13	15.3
Σπειραματονεφρίτιδες	10	11.7
Διάμεση νεφροπάθεια	10	11.7
Νεφρολιθίαση	8	9.4
Διαβητική Νεφροπάθεια	30	35.2
Άγνωστη	14	16.4

Ο μέση τιμή του υπολογιζόμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR) για αυτούς τους ασθενείς έγινε με την χρήση της εξίσωσης MDRD και ήταν 34 (17-90) ml/min/1.73m². Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι ΔΝ:

- Ομάδα 1: 55 ασθενείς (30 άνδρες, 25 γυναίκες και μέση ηλικία 66±11 έτη) με ΧΝΝ χωρίς ΣΔ (ΧΝΝ ομάδα).
- Ομάδα 2: 30 ασθενείς (20 άντρες, 10 γυναίκες και μέση ηλικία 67±8 έτη) με κλινικές και/ή ιστοπαθολογικές ενδείξεις ΔΝ (ΔΝ ομάδα).

Οι δύο ομάδες συγκρίθηκαν με μια ομάδα ελέγχου που συμπεριέλαβε 36 υγιή άτομα (15 άντρες, 21 γυναίκες και μέση ηλικία 61±10 έτη). Τα άτομα αυτά δεν είχαν ιστορικό νεφρικού νοσήματος, αρτηριακής υπέρτασης, ΣΔ, στεφανιαίας νόσου, υπερλιπιδαιμίας και ανοσολογικών νοσημάτων και δεν λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή. Η συμμετοχή τόσο των ασθενών όσο και των ατόμων της ομάδας ελέγχου έγινε μετά από προφορική ενημέρωσή τους από τους θεράποντες ιατρούς και μετά από λήψη συναίνεσης σύμφωνα με τους όρους του Επιστημονικού Συμβουλίου του Νοσοκομείου.

6.2. Μέθοδοι

Οι ασθενείς και τα υγιή άτομα της ομάδας ελέγχου, υποβλήθηκαν σε πλήρη αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο και σε συλλογή δείγματος ούρων την ημέρα ένταξης στους στη μελέτη. Τα δείγματα αίματος ελήφθησαν από περιφερική φλέβα του άνω άκρου μετά από 8ωρη τουλάχιστον νηστεία. Επίσης και στις τρεις εξεταζόμενες ομάδες προσδιορίστηκε:

- 1) η έκφραση των διαμεμβρανικών υποδοχέων TLR2 και TLR4 σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, ενώ σε υποομάδα του πληθυσμού (25 ασθενείς από ομάδα 1, 19 ασθενείς από ομάδα 2 και 20 ασθενείς από ομάδα ελέγχου) έγινε επιπλέον προσδιορισμός και σε διεγερμένα μονοκύτταρα με τον συνδέτη του TLR2, το συνθετικό λιποπεπτίδιο Pam3CSK4. Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε άμεσα, ενώ ο υπολογισμός της έκφρασης των υποδοχέων έγινε μέσω κυτταρομετρίας ροής
- 2) η ενδοκυττάρια έκφραση των ιντερλευκινών IL-1 β και IL-6 μετά από επαγωγή με τον Pam3CSK4 μέσω κυτταρομετρίας ροής σε υποομάδα του πληθυσμού (30 ασθενείς από ομάδα 1, 26 ασθενείς από ομάδα 2 και 26 ασθενείς από ομάδα ελέγχου)
- 3) στο σύνολο του εξεταζόμενου πληθυσμού έγινε μέτρηση των επιπέδων 27 φλεγμονωδών παραγόντων (κυτοκινών, χυμοκινών και αυξητικών παραγόντων) στον ορό μέσω μεθόδου πολλαπλής χαρτογράφησης. Τα δείγματα μετά τη λήψη τους φυγοκεντρήθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι τη στιγμή της τελικής επεξεργασίας τους.

Ο εργαστηριακός έλεγχος ρουτίνας έγινε μέσω τυποποιημένων μεθόδων χρησιμοποιώντας τον κλινικό χημικό αναλυτή Olympus AU 600 (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany). Η απέκκριση πρωτεΐνης ούρων εκφράστηκε ως λόγος πρωτεΐνη προς κρεατινίνη σε τυχαίο πρωινό δείγμα ούρων (protein to creatinine ratio, uPCR).

6.2.1. Προσδιορισμός μεμβρανικής έκφρασης των TLR2 και TLR4 σε μη διεγερμένα και σε διεγερμένα με Pam3CSK4 μονοκύτταρα ολικού αίματος μέσω κυτταρομετρίας ροής

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z 320)
- Anti-CD14-FITC (Becton Dickinson Biosciences) (monocyte marker)
- Anti- human CD282-PE ,αντιστοιχεί στον TLR2 (clone TL2.1, Bio Legend)
- Anti- human CD284-PE ,αντιστοιχεί στον TLR4 (clone HTA 125, Bio Legend)
- Σωληνάκια πολυστυρενίου των 5mL (12x75mm, Becton Dickinson)
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Fluka)
- Επωαστικός θάλαμος 37°C με 7% CO₂
- υδατόλουτρο 37°C

- Cell Quest πρόγραμμα (Becton Dickinson)
- Κυτταρόμετρο ροής FACS calibur (Flow Cytometer, Becton Dickinson)

Διαλύματα Εργασίας

- **Διάλυμα Pam3CSK4** (Invivi Gen) σε συγκέντρωση 3 μg/ml
- **Διάλυμα λύσης των κυττάρων.** Το διάλυμα αυτό περιέχει 0,834 g NH₄Cl, 0,0036 g K₂EDTA και 0,10 g KHCO₃ τα οποία διαλύονται σε απεσταγμένο νερό (distillated water, dH₂O). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,4 και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη των 100mL. Στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τα 100mL με dH₂O. Κατά τη διάρκεια του πειράματος φυλάσσεται σε πάγο. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10m MPBS (phosphate buffered dialysate), pH 7,4.** Το διάλυμα αυτό περιέχει 8,1816 g NaCl, 1,3800 g NaH₂PO₄· H₂O και 1,7795 g Na₂HPO₄· 2H₂O τα οποία διαλύονται σε 800 mL dH₂O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7,4 συμπληρώνεται ο όγκος στο 1L με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Αρχή της μεθόδου

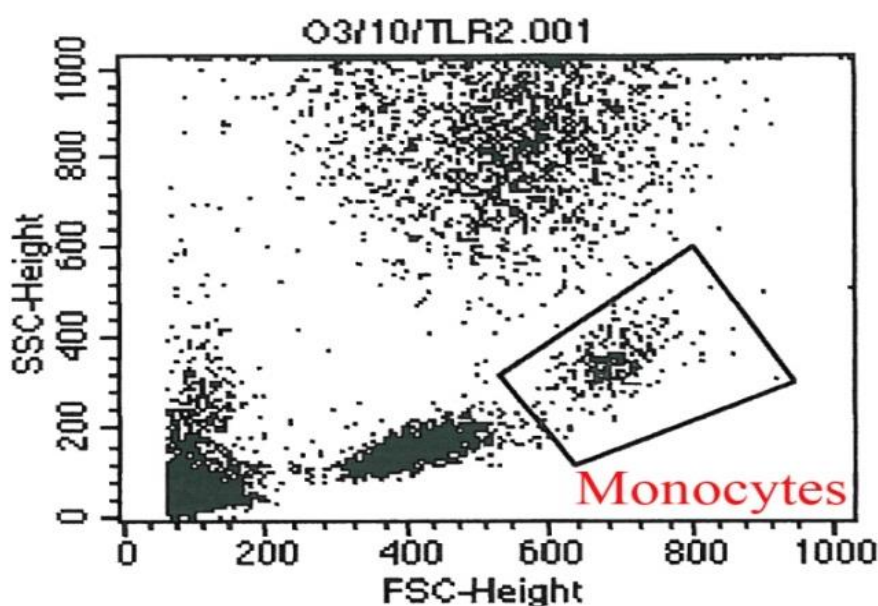
Η κυτταρομετρία ροής είναι μια μέθοδος που μετράει ταυτόχρονα πολλαπλά χαρακτηριστικά κυττάρων με γρήγορη ταχύτητα. Ένα κυτταρόμετρο ροής μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για έναν κυτταρικό πληθυσμό ως προς:

- το σχετικό του μέγεθος (forward scatter – FSC)
- τη σχετική κοκκίωση ή εσωτερική πολυπλοκότητα (side scatter – SSC)
- τη σχετική ένταση φθορισμού

Το Becton Dickinson FACS calibur είναι ένα σύστημα κυτταρόμετρου ροής που αναγνωρίζει τρία φθοριοχρώματα (FITC fluorescein isothiocyanate, PE phycoerythrin και PerCP peridinin-chlorophyll-protein complex). Έχει ως πηγή φωτός μια ακτίνα laser Αργού, η οποία παράγει φως ισχύος 15mW και μήκος κύματος 488nm επιτρέποντας τις δύο παραμέτρους σκέδασης (FSC και SSC) και τα κανάλια φθορισμού να ανιχνευθούν. Η ακτίνα του laser προμηθεύει μια περιοχή φωτός αρκετά μεγάλη για τα περισσότερα είδη κυττάρων ώστε να υπάρχει πλήρης φωτισμός εντός της ακτίνας και να δίνει μια ομοιόμορφη διέγερση όλων των κυττάρων τα οποία περιέχονται στο δείγμα. Η εστιασμένη ακτίνα laser αλληλεπιδρά με τα φθορίζοντα αντισώματα με τα οποία έχει επισημανθεί ένα κύτταρο, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ταυτόχρονα σκεδασμένο φως καθώς και σήματα φθορισμού. Με τα κατάλληλα φθορίζοντα αντισώματα έχουμε τη δυνατότητα να μελετήσουμε διάφορα κύτταρα και την αλληλεπίδρασή τους με τα αντισώματα αυτά. Στο κυτταρόμετρο τα κύτταρα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος και την κοκκίωση τους. Επίσης, το καθένα από τα αντισώματα έχει επισημανθεί με μια φθορίζουσα ουσία η οποία εκπέμπει σε ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (FITC = 530nm/30, PE = 585nm/42 και PerCP = 650nm). Όμως, όλες οι φθορίζουσες ουσίες με τις οποίες είναι επισημασμένα τα

αντισώματα που χρησιμοποιούνται στη κυτταρομετρία διεγείρονται στο ίδιο μήκος κύματος (488nm).

Χρησιμοποιούμε αντισώματα όπως το CD14-FITC (που αναγνωρίζει τα μονοκύτταρα), το CD282-PE (που αναγνωρίζει τον TLR2) και το CD284-PE (που αναγνωρίζει τον TLR4). Με αυτό τον τρόπο μελετάται η μεμβρανική έκφραση των υποδοχέων σε μονοκύτταρα περιφερικού φλεβικού αίματος με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Στην εικόνα 7 απεικονίζεται ο πληθυσμός των μονοκυττάρων σε ολικό πληθυσμό λευκοκυττάρων που έχει επισημανθεί με βάση το μέγεθος ή FSC και την κοκκίωση SSC όπως αυτή λαμβάνεται από το κυτταρόμετρο.



Εικόνα 7. Ταυτοποίηση των μονοκυττάρων μέσω της κυτταρομετρίας ροής

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά συλλέγονται 10 ml περιφερικού φλεβικού αίματος σε Vacutainer σωληνάκια της Becton Dickinson που περιέχουν αντιπηκτικό K₂EDTA 18,0mg.

1. Σε δύο ειδικά σωληνάκια κυτταρομέτρου της Becton Dickinson διαλύουμε 1mL ολικού αίματος με 1mL RPMI, ενώ ένα από τα δύο δείγματα ενεργοποιείται με 3μg/mL Pam3CSK4 και κάνουμε μικρή ανάδευση
2. Επώαζουμε στους 37°C με 7% CO₂ για 2 ώρες
3. Σε δύο νέα σωληνάκια προσθέτουμε τα αντισώματα anti-CD14-FITC και anti-CD282-PE(anti-TLR2) ή anti-CD284-PE (anti-TLR4) και αναμειγνύουμε με 30μL αίματος και κάνουμε μικρή ανάδευση
4. Επώαζουμε στους 37 °C για 10 min
5. Προσθέτουμε 2mL διαλύματος λύσης των κυττάρων και τοποθετούμε τα δείγματα στο σκοτάδι για 20 min

6. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 5min σε φυγόκεντρο πάγκου.
7. Το υπερκείμενο αποχύνεται και προσθέτουμε 500μL PBS
8. Ακολουθεί ανάδευση και ανάλυση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο ροής για τον προσδιορισμό της μεμβρανικής έκφρασης των υποδοχέων TLR2 και TLR4 στα μονοκύτταρα. Η προαναφερθείσα διαδικασία πρέπει να ολοκληρωθεί εντός τριών ωρών από τη συλλογή των δειγμάτων.

6.2.2. Προσδιορισμός των επιπέδων των ενδοκυττάρων κυτοκινών IL-6 και IL-1β σε μονοκύτταρα ολικού αίματος πριν και μετά την ενεργοποίηση με τον Pam3CSK4 μέσω κυτταρομετρία ροής

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου (Herm Le, Z 320)
- Anti- CD14-FITC (Becton Dickinson Biosciences)
- Anti- human IL-6-PE (Becton Dickinson Biosciences)
- Anti- human IL-1β-PE (Becton Dickinson Biosciences)
- Σωληνάκια πολυστυρενίου των 5mL (12x75mm, Becton Dickinson)
- Cell Quest πρόγραμμα (Becton Dickinson)
- Κυτταρόμετρο ροής FACS calibur (Becton Dickinson)
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Fluka)
- Υδατόλουτρο 37°C
- Brefeldin A (Sigma)
- Επωαστικός θάλαμος 37°C με 7% CO₂
- FACS Lysing Solution 10X (Becton Dickinson)
- FACS Permeabilizing Solution 10X (Becton Dickinson)
- BSA – Albumin from bovine serum (Sigma)

Διαλύματα Εργασίας

- **Διάλυμα Pam3CSK4** (Invivi Gen)σε συγκέντρωση 3 μg/mL
- **Διάλυμα brefeldin (BFA) 5mg/mL**. Η εμπορική του συσκευασία περιέχει 5mg ουσίας τα οποία αναμιγνύονται με 1mL αιθανόλης.
- **FACS Lysing solution 1X**. Αναμιγνύονται 1mL του 10X με 9mL ddH₂O.
- **FACS Permeabilizing solution 1X**. Αναμιγνύονται 1mL του 10X με 9mL ddH₂O.
- **Wash buffer PBS/0,1% BSA**. Διαλυτοποιούνται 50mg BSA σε 50mL PBS. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα παραφορμαδεΐδης 1%**. Θερμαίνουμε 1,6LPBS στους 80°C και προσθέτουμε 60g παραφορμαδεΐδης υπό ανάδευση. Αναμιγνύουμε μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Προσθέτουμε 200μL 1M CaCl₂ και 200μL 1M MgCl₂ μέχρι τα 2L. Παράλληλα αναδεύουμε το θερμό διάλυμα για να αποφευχθεί η

δημιουργία ιζήματος. Αφήνεται να ψυχθεί, ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και συμπληρώνεται με PBS μέχρι τα 2L. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

Αρχή της μεθόδου

Το αίμα συλλέγεται σε Vacutainer σωληνάκια της Becton Dickinson που περιέχουν νατριούχο ηπαρίνη. Η ενεργοποίηση πραγματοποιείται παρουσία της brefeldin A (BFA). Η BFA είναι ένας μεταβολίτης που παράγεται από τον μύκητα *Penicillium brefeldianum*. Αναστέλλει την ενδοκυττάρια μεταφορά εκκριτικών πρωτεϊνών ώστε τα αντιγόνα και οι κυτοκίνες που παράγονται κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων να παραμένουν μέσα στο κύτταρο. Ο Pam3CSK4 προστίθεται για την διέγερση των μονοκυττάρων. Τα μη διεγερμένα δείγματα ελέγχου πρέπει επίσης να περιέχουν BFA. Το FACS Lysing διάλυμα προορίζεται για τη λύση των ερυθροκυττάρων διατηρώντας παράλληλα τα λευκοκύτταρα ενώ το FACS Permeabilizing διάλυμα χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί η διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών πριν από την ενδοκυττάρια ανοσοφθορισμική χρώση με μονοκλωνικά αντισώματα. Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η παραγωγή της IL-1β και της IL-6 πριν και μετά τη διέγερση με ένα από τα κυριότερα προσδέματα του TLR2, την συνθετική λιποπρωτεΐνη Pam3CSK4.

Πειραματική διαδικασία

1. Παίρνουμε δύο σωληνάκια πολυστηρενίου για κάθε δείγμα και προσθέτουμε 1ml ολικού αίματος. Στο κάθε σωληνάκι τοποθετούμε 1mL RPMI, 15 μg/mL BFA και στη συνέχεια ενεργοποιούμε το ένα από τα δύο με 3 μg/ml Pam3CSK4
2. Τοποθετούμε τα δείγματα σε επωαστικό θάλαμο 37°C με 7% CO₂ για 4 ώρες.
3. Παίρνουμε δύο νέα σωληνάκια και τοποθετούμε στο καθένα από 10μL CD14 και 500μL αίματος από το ενεργοποιημένο με Pam3CSK4 και το μη διεγερμένο σωληνάκι αντίστοιχα. Επωάζουμε στο σκοτάδι για 15-30 min σε θερμοκρασία δωματίου
4. Προσθέτουμε 2mL FACS Lysing Solution 1X και επωάζουμε στο σκοτάδι για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 5 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου
6. Προσθέτουμε 500μL FACS Permeabilizing Solution και επωάζουμε στο σκοτάδι για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
7. Προσθέτουμε 2mL wash buffer, φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές για 5 min και απομακρύνουμε το υπερκείμενο
8. Προσθέτουμε 10μL IL-1β (ή IL-6) σε 50μL RPMI και επωάζουμε στο σκοτάδι για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου
9. Προσθέτουμε 2mL wash buffer, φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές για 5 min και απομακρύνουμε το υπερκείμενο
10. Προσθέτουμε 500μL παραφορμαλδεΰδης 1% και ακολουθεί ανάλυση στο κυτταρόμετρο.

6.2.3. Προσδιορισμός φλεγμονωδών πρωτεϊνών στον ορό

Αντιδραστήρια –Όργανα

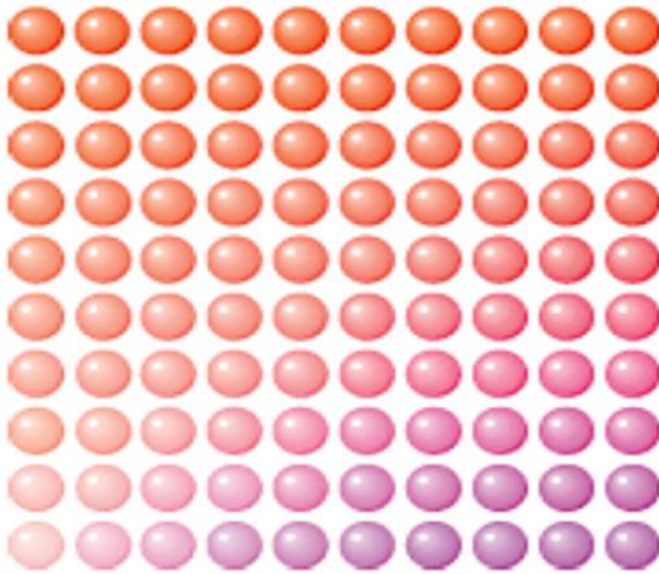
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου
- Bio-Plex Manager λογισμικό
- Σύστημα πολλαπλής ανάλυσης (Bio Plex 200, Bio Rad)
- Ανακινούμενη βάση
- Πλυστικό μηχάνημα (Bio Plex wash station)
- Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex Assay Kit (Bio-Rad): Περιέχει μαγνητικά σωματίδια (10x), αντισώματα ανίχνευσης (10x), πρότυπο για τον προσδιορισμό κυτοκινών σε λυοφιλοποιημένη μορφή, Streptavidin PE (100x), διάλυμα εναιώρησης προτύπου 10mL, διάλυμα εναιώρησης δειγμάτων 8mL, διάλυμα εναιώρησης των αντισωμάτων ανίχνευσης 5mL, διάλυμα έκπλυσης 150mL, διάλυμα εργασίας 50mL, ταινίες σφράγισης και πλακίδιο 96 θέσεων.

Διαλύματα εργασίας

- **Πρότυπο διάλυμα κυτοκινών.** Το πρότυπο είναι σε λυοφιλοποιημένη μορφή και διαλυτοποιείται σε 500μL διαλύματος εναιώρησης προτύπου. Διατηρείται στον πάγο και παραμένει σταθερό για 4 ώρες.
- **Διάλυμα μαγνητικών σωματιδίων.** 575μL του εναιωρήματος των σωματιδίων (10x) αραιώνονται σε 5,175mL διαλύματος εργασίας.
- **Διάλυμα αντισωμάτων ανίχνευσης.** Διαλυτοποιούνται 300μL αντισώματος ανίχνευσης σε 2,7mL διαλύματος εναιώρησης των αντισωμάτων ανίχνευσης.
- **Διάλυμα Streptavidin-PE.** Διαλυτοποιούνται 60μL streptavidin-PE σε 5,94mL διαλύματος εργασίας.

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνολογία πολλαπλής χαρτογράφησης (xMAP) είναι μια σύγχρονη μέθοδος που χρησιμοποιεί μεθόδους κυτταρομετρίας ροής, μικροσφαιρίδια, lasers, ψηφιακή επεξεργασία σήματος και παραδοσιακές χημικές μεθόδους, συνδυασμένα με ένα μοναδικό τρόπο. Προσφέρει τη δυνατότητα να πραγματοποιεί ευρύ φάσμα βιολογικών εξετάσεων γρήγορα, οικονομικά και με ακρίβεια. Ειδικότερα, το BioPlex 200 είναι ένα σύστημα ανάλυσης πρωτεϊνών το οποίο στηρίζεται στην μέθοδο της μικροσωματιδιακής ανοσοενζυμικής τεχνολογίας. Βασίζεται στην χρήση 100 μαγνητικών μικροσφαιριδίων του ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικής σήμανσης, η οποία πραγματοποιείται από την χρήση δύο διαφορετικών φθορισμών σε δέκα διαφορετικές συγκεντρώσεις που εκπέμπουν σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος (πορτοκαλί και κόκκινο) (Εικόνα 8). Για κάθε οικογένεια μικροσφαιριδίων πραγματοποιούνται πολλαπλές μετρήσεις έτσι ώστε να επαληθευτούν τα αποτελέσματα. Με αυτό τον τρόπο η τεχνολογία xMAP επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση μέχρι και 100 διαφορετικών παραγόντων στο ίδιο αρχικό δείγμα γρήγορα και με ακρίβεια.



Εικόνα 8. Εκατό διαφορετικές αναλογίες των χρωματισμένων μικροσφαιριδίων

Το Bio-Plex σύστημα αποτελείται από έναν πλήρως ολοκληρωμένο αναγνώστη και μια πλατφόρμα μικροπλάκας με μία αντλία υψηλής απόδοσης ρευστών. Τα μικροσφαιρίδια χρωματίζονται και κατατάσσονται σε 100 διαφορετικές αναλογίες. Κάθε μία οικογένεια μικροσφαιριδίων μπορεί να επιστρωθεί με μία ουσία/αντιδραστήριο που επιτρέπει την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου αντίστοιχου παράγοντα σε μία βιολογική εξέταση. Στη συνέχεια προστίθεται το δείγμα στα μικροσφαιρίδια και η αναλυτέα ουσία δεσμεύεται. Στο τέλος προστίθεται το αντίσωμα ανίχνευσης. Η ανάλυση πραγματοποιείται σε πλάκα 96 θέσεων και στη συνέχεια εισάγεται στην πλατφόρμα. Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιείται το Bio-Plex Manager λογισμικό. Το σύστημα ανίχνευσης χρησιμοποιεί δύο laser για την ανάλυση των μικροσφαιριδίων σε ένα ρεύμα ροής. Το πρώτο laser προσδιορίζει το κάθε μικροσφαιρίδιο και την σχετιζόμενη αναλυτέα ουσία με βάση το φθορισμό του μικροσφαιριδίου και το δεύτερο laser μετρά την ποσότητα της αναλυτέας ουσίας. Όταν η ανάλυση ολοκληρωθεί το Bio-Plex Manager εμφανίζει τα δεδομένα και παράγει λεπτομερείς εκθέσεις των αποτελεσμάτων.

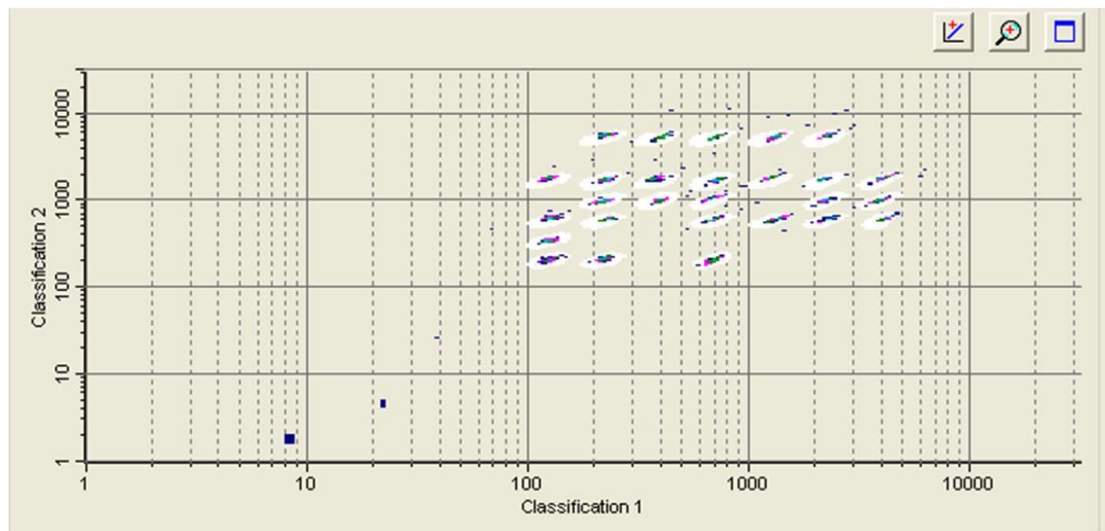
Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήσαμε το Bio-Plex ProHuman Cytokine kit το οποίο περιέχει αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό 27 κυτοκινών (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex Assay

IL-1 β	IL-10	IFN- γ
IL-1ra	IL-12	IP-10
IL-2	IL-13	MCP-1
IL-4	IL-15	MIP-1 α
IL-5	IL-17	MIP-1 β
IL-6	Eotaxin	PDGF-BB
IL-7	Basic FGF	RANTES
IL-8	G-CSF	TNF- α
IL-9	GM-CSF	VEGF

FGF: ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας, G-CSF: διεγερτικός παράγοντας κοκκιοκυττάρων, GM-CSF: διεγερτικός παράγοντας κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων, IFN- γ : ιντερφερόνη- γ , IP-10: επαγωγή πρωτεΐνη-10 της ιντερφερόνης, MCP-1: χυμοτακτική πρωτεΐνη-1των μονοκυττάρων, MIP: φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μονοκυττάρων, PDGF: αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων, VEGF: αυξητικός παράγοντας ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγείου

Για κάθε μέτρηση που πραγματοποιείται σε μία θέση του πλακιδίου λαμβάνεται το παρακάτω διάγραμμα μικροσφαιριδίων, όπου κάθε μικροσφαιρίδιο εντοπίζεται με διαφορετικό συνδυασμό χρωμάτων (Εικόνα 9).



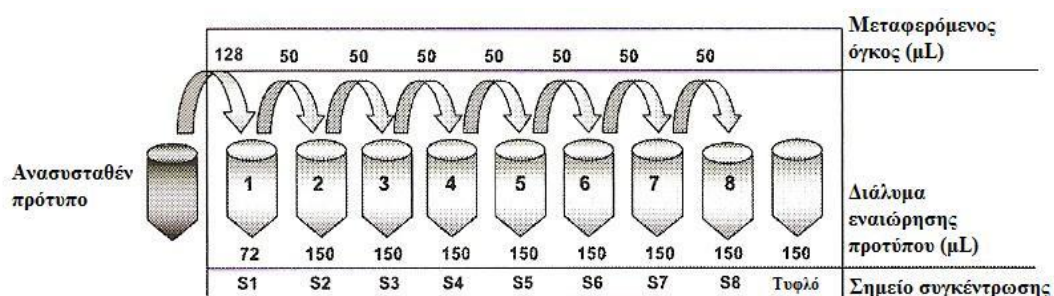
Εικόνα 9. Διάγραμμα αναπαράστασης των μικροσφαιριδίων για κάθε μέτρηση

Πειραματική διαδικασία

Χρησιμοποιούνται δείγματα ορού τα οποία αμέσως μετά την παρασκευή τους (εντός τριών ωρών από την αιμοληψία) τοποθετούνται στους -80°C . Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στο πλακίδιο και αφού πραγματοποιήθηκε απόψυξη και καλή ομογενοποίηση των δειγμάτων, φυγοκεντρούμε στις 13.200 rpm για 10 min στους 4°C για την απομάκρυνση ιζημάτων. Λαμβάνουμε 30μL δείγματος και κάνουμε αραιώση $\frac{1}{4}$ με το διάλυμα εναιώρησης των δειγμάτων τοποθετώντας 90μL διαλύματος σε κάθε θέση του πλακιδίου. Αναμιγνύουμε με την πιπέτα ώστε να έχουμε ένα καλά ομογενοποιημένο δείγμα.

1. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται ως εξής:

Μεταφέρουμε 128μL του προτύπου διαλύματος κυτοκινών και 72μL του διαλύματος εναιώρησης προτύπου στην πρώτη θέση του πλακιδίου. Στη συνέχεια πραγματοποιούμε διαδοχικές αραιώσεις μεταφέροντας 50μL κάθε φορά. Σε όλες τις θέσεις τοποθετούμε από 150μL διαλύματος εναιώρησης προτύπου. Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων δειγμάτων ποικίλουν για κάθε κυτοκίνη.



2. Στη συνέχεια σε ένα άλλο πλακίδιο 96 θέσεων (ειδικό μαύρο) τοποθετούμε 50μL από το εναιώρημα μαγνητικών σωματιδίων σε κάθε θέση και ακολουθεί πλύση 2 φορές σε πλυστικό μηχάνημα (BioPlex wash station) για την απομάκρυνση πιθανής περίσσειας χρωμοφόρων ομάδων.
3. Μεταφέρουμε 50μL από τα πρότυπα και τα δείγματα του προηγούμενου πλακιδίου στο πλακίδιο που είχαμε τοποθετήσει τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια και επωάζουμε για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί πλύση 3 φορές στο BioPlex wash station.
4. Προσθέτουμε 25μL διαλύματος ανίχνευσης αντισώματος σε κάθε θέση του πλακιδίου και επωάζουμε για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί πλύση 3 φορές στο Bio Plax wash station.
5. Προσθέτουμε 50μL διαλύματος streptavidin-PE σε κάθε θέση του πλακιδίου και επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί πλύση 3 φορές στο Bio Plex wash station.
6. Προσθέτουμε 125μL διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση του πλακιδίου. Η πλάκα ανακινείται ήπια για 30sec σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρεται στον μετρητή για ανάλυση.

7. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων που αναλύθηκαν γίνεται με πρότυπες καμπύλες χρησιμοποιώντας λογισμικό που χορηγείται από τον κατασκευαστή (Bio-Plex Manager Software version 6.0). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως συγκέντρωση σε pg/ml.

6.3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS 17. Το Kolmogorov-Smirnov test χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογήσει ποιες από τις παραμέτρους ακολούθησε κατανομή Gauss. Τα αποτελέσματα με κανονική κατανομή εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (mean \pm SD), ενώ οι τιμές με ελεύθερη κατανομή (μη-παραμετρική) ως διάμεσος (median). Η σύγκριση τιμών των διαφόρων παραμέτρων με κανονική κατανομή έγινε με τη μέθοδο Independent-Samples T Test, ενώ για τις παραμέτρους με ελεύθερη κατανομή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Mann Whitney U test. Η συσχέτιση μεταξύ δυο μεταβλητών έγινε με την παραμετρική μέθοδο Pearson και τη μη παραμετρική μέθοδο Spearman για τις παραμέτρους με κανονική και ελεύθερη κατανομή αντίστοιχα. Η stepwise multiple regression analysis (πολλαπλή σταδιακή παλινδρόμηση) διεξήχθη για να ορίσει τους προγνωστικούς παράγοντες της φλεγμονής. Οι μεταβλητές που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση ήταν η ηλικία, MDRD, uPCR και ο TLR2 για την ομάδα 1 και οι TLR2 και TLR4 για την ομάδα 2. Η συσχέτιση θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική για τιμή του $p < 0.05$.

Κεφάλαιο 7. Αποτελέσματα

7.1. Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Στη μελέτη εντάχθηκαν 85 ενήλικες ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 1-4 και 36 υγιή άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου από το Εξωτερικό Νεφρολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Στον πίνακα 9 φαίνονται τα χαρακτηριστικά βασικών κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων. Όλοι οι ασθενείς της ομάδας 2 ήταν σε αγωγή με ινσουλίνη για τη ρύθμιση του σακχαρώδη διαβήτη.

Πίνακας 9. Βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης			
	Ομάδα ελέγχου (n=36)	Ομάδα 1 (ΧΝΝ ομάδα) (n=55)	Ομάδα 2 (ΔΝ ομάδα) (n=30)
Χαρακτηριστικά ασθενών			
Φύλο (M/F)	15/21	36/19	20/10
Ηλικία (years)	58±14	66±14*	67±10*
BMI (kg/m ²)	29±5	29±3	29±4
ΣΑΠ (mmHg)	127±16	139±17	141±16
ΔΑΠ (mmHg)	75±5	81±10	83±9
Κάπνισμα (n, %)	9 (25)	13(23.6)	7(23.3)
Hb (g/dl)	14.2±1.4	12.7±1.9*	12.2±1.8*
HbA1c (mg/dl)	5.0 (4.6-6.6)	5.8 (5.0-6.6)	7.8 (5.2-11.3)*, #
Glucose (mg/dl)	90 (70-120)	97 (68-145)	146 (68-251)*, #
Urea (mg/dl)	37 (26-54)	80 (45-250)*	96 (42-210)*
Creatinine (mg/dl)	0.9 (0.7-1.3)	2.1 (1.4-6.5)*	2.1 (1.4-6.0)*
Uric acid (mg/dl)	4.8±0.8	7.3±2.1*	8.2±2*
Ferritin (ng/ml)	65 (10-201)	73 (10-465)	123 (23-408) [§]
Albumin (g/dl)	4.2±0.28	4.1±0.32	3.9±0.40 [§]
Total Cholesterol (mg/dl)	188±11	195±34	209±20
Triglycerides (mg/dl)	98 (54-185)	126 (55-282) [§]	137 (67-350) ^{§, #}
LDL-C (mg/dl)	105±43	122±30	129±26
HDL-C (mg/dl)	57±8	47±16 [§]	41±13 ^{§, #}
hsCRP (mg/l)	1.35±0.5	4.2±2.8*	4.7±3.1*
uPCR (mg/g)	30 (10-90)	340 (20-3300) [§]	2100(900-9900)*, #
eGFR-MDRD (ml/min/1.73m ²)	72 (62-102)	35 (18-90)*	31 (17-71)*

*p<0.001 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, [§]p<0.02 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και [#]p<0.001 σε σχέση με την ομάδα 1. Συντομομορφίες: BMI: body mass index, ΣΑΠ: συστολική αρτηριακή πίεση, ΔΑΠ: διαστολική αρτηριακή πίεση, Hb: hemoglobin, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, HbA1c: glycosylated hemoglobin, hsCRP: C-reactive protein high sensitivity, uPCR: urine protein to creatinine ratio, GFR-MDRD: estimated glomerular filtration rate using Modification of Diet in Renal Disease formula

Όπως φαίνεται στον πίνακα 9 και οι δύο ομάδες ασθενών είχαν στατιστικά σημαντική χαμηλότερη αιμοσφαιρίνη και υψηλότερα επίπεδα ουρίας, κρεατινίνης, ουρικού οξέως και hsCRP σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, και οι δύο ομάδες ασθενών είχαν στατιστικά χαμηλότερη eGFR (MDRD) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η ομάδα 2, όπως ήταν αναμενόμενο εμφάνισε στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σακχάρου ορού και γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης σε σχέση με τις άλλες δύο εξεταζόμενες ομάδες. Κατά ανάλογο τρόπο τα επίπεδα της φεριττίνης ήταν υψηλότερα, ενώ τα επίπεδα της αλβουμίνης ήταν χαμηλότερα σε σχέση με την ομάδα 1 και με την ομάδα ελέγχου. Ο λόγος πρωτεΐνη προς κρεατινίνη στα ούρα ήταν υψηλότερος και στις δύο ομάδες των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, όντας υψηλότερος στην ομάδα 2 σε σχέση με την ομάδα 1. Τέλος, και οι δύο ομάδες των ασθενών εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα HDL και υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε σχέση με τους υγιείς, ενώ ανάλογες στατιστικές διαφορές παρατηρήθηκαν ανάμεσα στην ομάδα της ΔΝ και την ΧΝΝ ομάδα.

7.2. Μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 στα μονοκύτταρα

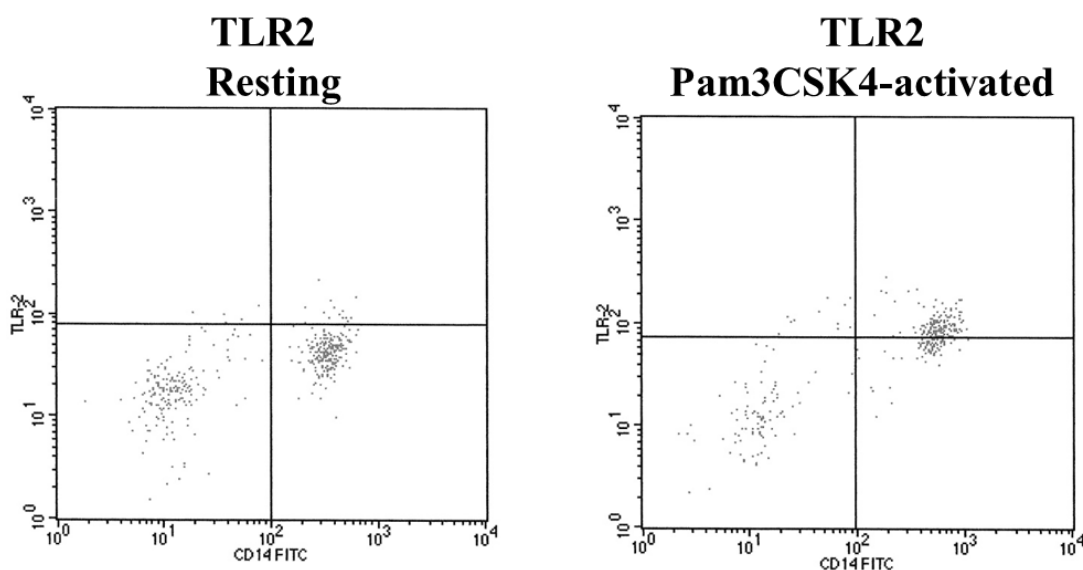
Ο προσδιορισμός της μεμβρανικής έκφρασης των υποδοχέων TLR2 και TLR4 έγινε με κυτταρομετρία ροής. Μελετήσαμε τα μονοκύτταρα σε ολικό αίμα ασθενών. Ταυτοποιήσαμε με κυτταρομετρία ροής τα μονοκύτταρα με βάση την έκφραση του CD14 χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-CD14-FITC (γενικός δείκτης μονοκυττάρων). Όπως προαναφέρθηκε, για την έκφραση των υποδοχέων χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα anti-CD282-PE που αντιστοιχεί στον TLR2 και anti-CD284-PE που αντιστοιχεί στον TLR4. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση ένταση φθορισμού (MFI - mean fluorescence intensity) καθώς και ως % ποσοστό των CD14+ μονοκυττάρων που εκφράζουν τον TLR2 και τον TLR4 (%Gated).

Η μεμβρανική έκφραση του TLR2 (εκφρασμένη είτε ως MFI ή ως % TLR2+/CD14+) σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα ήταν στατιστικά αυξημένη και στις δύο ομάδες ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Μετά τη διέγερση με τον Pam3CSK4 παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της μεμβρανικής έκφρασης του TLR2 και στις τρεις ομάδες, ενώ η αύξηση αυτή ήταν πιο έντονη στις δύο ομάδες ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του TLR2 ούτε στα μη διεγερμένα, ούτε στα διεγερμένα μονοκύτταρα με τον συνδέτη στις δύο ομάδες ασθενών (πίνακας 10). Η εικόνα 10 απεικονίζει μια αντιπροσωπευτική κυτταρομετρική εικόνα ενεργοποίησης του TLR2 από τον Pam3CSK4 σε CD14+ μονοκύτταρα της ομάδας 1.

Πίνακας 10. Μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 σε μη διεγερμένα και διεγερμένα μονοκύτταρα

	Ομάδα ελέγχου		Ομάδα 1 (XNN ομάδα)		Ομάδα 2 (ΔN ομάδα)	
	Resting	Stimulated	Resting	Stimulated	Resting	Stimulated
TLR2 (MFI)	119±27	176±49*	143±44 [§]	229±64* [#]	151±41 [§]	220±57* [#]
TLR2 ⁺ /CD14 ⁺ (%)	64±12	75±13*	84±12 [§]	96±13* [#]	83± 11 [§]	97±10* [#]
TLR4 (MFI)	47±22	92±35*	50±21	93±35*	62±22 [§]	120±36* [‡]
TLR4 ⁺ /CD14 ⁺ (%)	62±9	75±8*	64±10	76±15*	81±11 [§]	96±10* [‡]

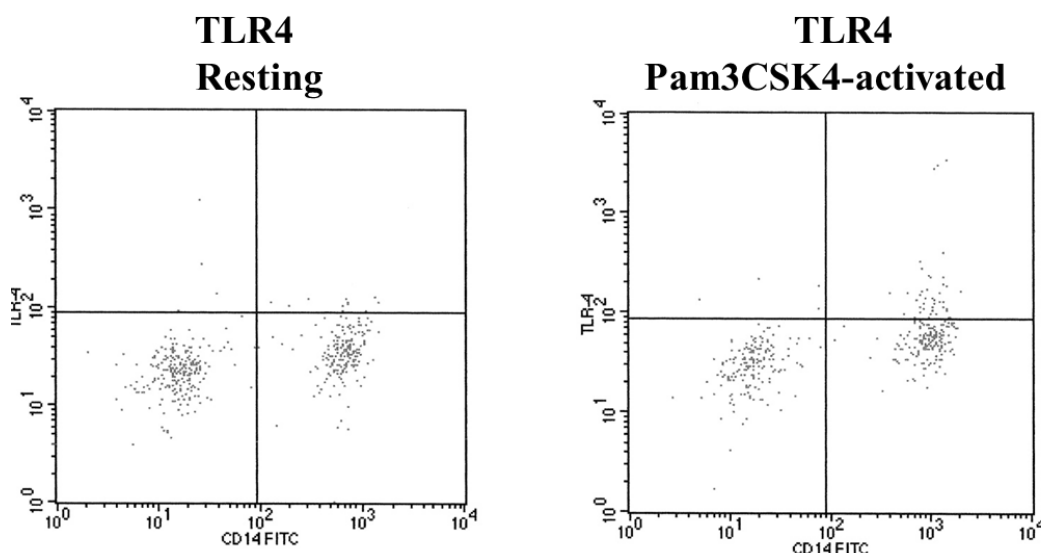
*p<0.01 σε σχέση με τα μη διεγερμένα κύτταρα της ίδιας ομάδας, [§]p<0.05 σε σχέση με τα μη διεγερμένα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, [§]p<0.02 σε σχέση με τα μη διεγερμένα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ή της ομάδας 1, [#]p<0.05 σε σχέση με τα διεγερμένα κύτταρα της ομάδας ελέγχου και [‡]p<0.05 σε σχέση με τα διεγερμένα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ή της ομάδας 1.



Εικόνα 10. Κυτταρομετρική εικόνα ενεργοποίησης του TLR2 από τον Pam3CSK4 σε CD14⁺ μονοκύτταρα σε ασθενείς της ομάδας 1

Η μεμβρανική έκφραση του TLR4 (εκφρασμένη είτε ως MFI ή ως % TLR2⁺/CD14⁺) σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς της ομάδας 2 σε σχέση με τους ασθενείς της ομάδας 1 και την ομάδα ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του TLR4 ανάμεσα στην ομάδα 1 και την ομάδα ελέγχου. Η διέγερση των μονοκυττάρων με τον Pam3CSK4 αύξησε στατιστικά σημαντικά την μεμβρανική έκφραση του TLR4 και

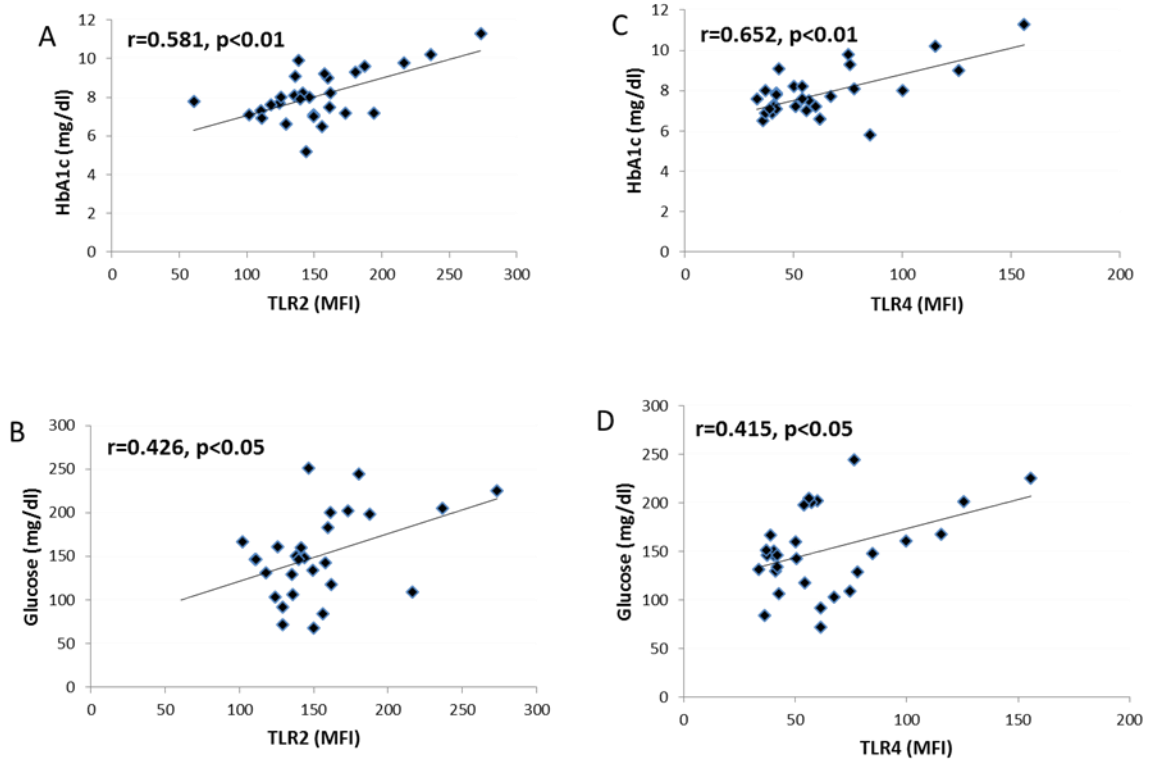
στις τρεις εξεταζόμενες ομάδες, με την ομάδα 2 να επιδεικνύει μεγαλύτερη έκφραση σε σχέση με την ομάδα 1 και την ομάδα ελέγχου (πίνακας 10). Η εικόνα 10 απεικονίζει μια αντιπροσωπευτική κυτταρομετρική εικόνα ενεργοποίησης του TLR4 από τον Pam3CSK4 σε CD14⁺ μονοκύτταρα ασθενών της ομάδας 2.



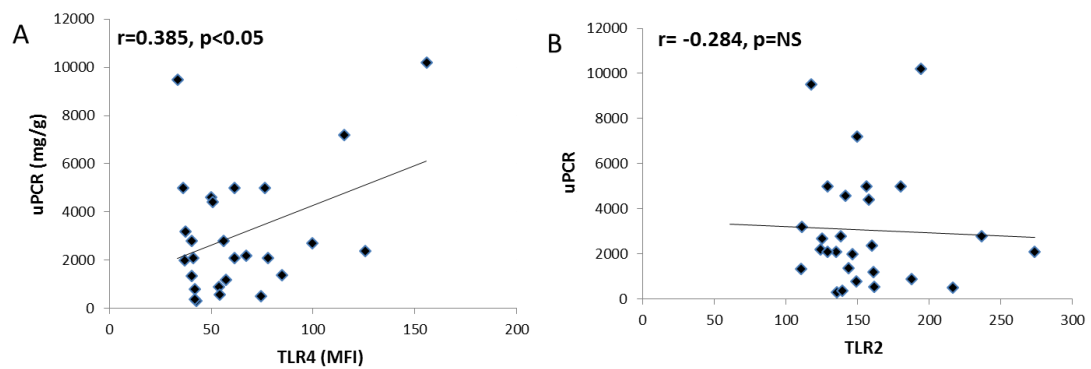
Εικόνα 11. Κυτταρομετρική εικόνα ενεργοποίησης του TLR4 από τον Pam3CSK4 σε CD14⁺ μονοκύτταρα σε ασθενείς της ομάδας 2

7.2.1. Συσχετίσεις των μεμβρανικών υποδοχέων TLR2 και TLR4

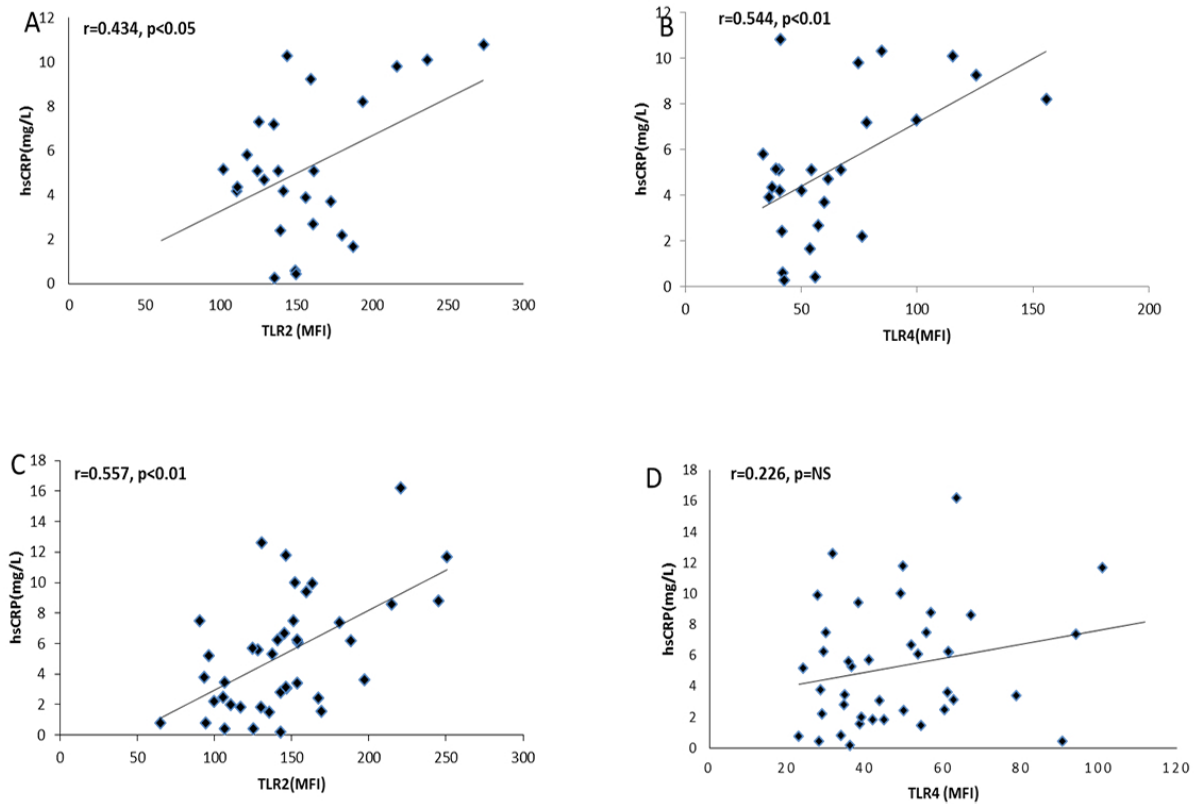
Η ομάδα 2 εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στους TLR2 και TLR4 υποδοχείς στα μη διεγερμένα μονοκύτταρα με την γλυκόζη ορού ($r=0.426$, $p<0.05$ και $r=0.415$, $p<0.05$ αντίστοιχα) και τη γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) ($r=0.581$, $p<0.01$ και $r=0.652$, $p<0.01$ αντίστοιχα) (εικόνα 11 A, B, C, D). Επίσης, η ομάδα 2 επέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον TLR4 και το λόγο πρωτεΐνης προς κρεατινίνης ούρων (uPCR) ($r=0.385$, $p<0.05$), ενώ δεν παρατηρήθηκε ανάλογη συσχέτιση για τον TLR2 ($r=-0.284$, $p=NS$) (εικόνα 12A, B). Τέλος, η ομάδα 2 επέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της hsCRP και των δύο TLR υποδοχέων, TLR2 ($r=0.434$, $p<0.05$) και TLR4 ($r=0.544$, $p<0.01$) αντίστοιχα (εικόνα 13 A, B). Αντιθέτως, στην ομάδα 1 η hsCRP συσχετίστηκε μόνο με τον TLR2 υποδοχέα ($r=0.557$, $p<0.01$) (εικόνα 13 C, D) και όχι με τον TLR4 υποδοχέα ($r=0.226$, $p=NS$) (εικόνα 14 C,D).



Εικόνα 11. Συσχετίσεις μεταξύ TLR2 υποδοχέα και HbA1c (A) ή γλυκόζη ορού (B), καθώς και μεταξύ TLR4 υποδοχέα και HbA1c (C) ή γλυκόζη (D) σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα ασθενών της ομάδας 2



Εικόνα 12. Συσχέτιση μεταξύ TLR4 υποδοχέα και uPCR (A) και έλλειψη συσχέτισης μεταξύ TLR2 και uPCR (B) σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα ασθενών της ομάδας 2



Εικόνα 13. Συσχετίσεις μεταξύ hsCRP και TLR2 (A) ή TLR4 (B) σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα ασθενών της ομάδας 2 και μεταξύ hsCRP και TLR2 (C) της ομάδας 1. Έλλειψη συσχέτισης hsCRP και TLR4 στην ομάδα 1 (D)

Επίσης, θελήσαμε να ορίσουμε τους ανεξάρτητους παράγοντες της φλεγμονής και στις δύο ομάδες ασθενών. Για το λόγο αυτό διεξήγαμε σταδιακή πολλαπλή παλινδρόμηση (stepwise multiple regression analysis) για να βρούμε τους ανεξάρτητους παράγοντες της hsCRP. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο TLR2 και ο uPCR ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες της hsCRP στην ομάδα 1. Στην ομάδα 2 ο TLR2 και TLR4 ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες της hsCRP (πίνακας 11).

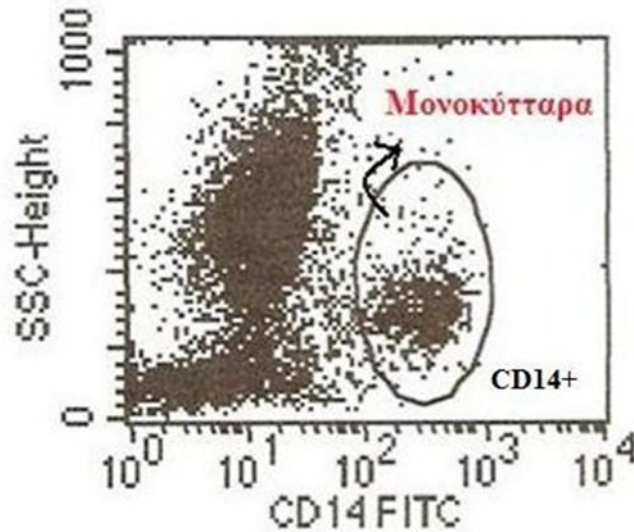
Σταδιακή πολλαπλή παλινδρόμηση για τους παράγοντες του hsCRP στους ασθενείς της ομάδας 1 και 2

Ομάδα	Dependent variable	Independent variable	β(coefficient)	R²	t-test student	p- value
1 (XNN)	hsCRP	TLR2	0.046	0.303	3.837	0.000
		uPCR	1.909	0.386	2.665	0.011
2 (ΔΝ)	hsCRP	TLR4	0.067	0.283	3.164	0.005
		TLR2	0.033	0.452	2.487	0.022

7.3. Επίπεδα των ενδοκυττάρων κυτοκινών IL-6 και IL-1 β σε μονοκύτταρα πριν και μετά την ενεργοποίηση με τον συνδέτη Pam3CSK4

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται πως οι ασθενείς με XNN με ή χωρίς την παρουσία ΔΝ παρουσιάζουν διαταραχές στην έκφραση των υποδοχέων TLR2 και TLR4. Για το λόγο αυτό θελήσαμε να διερευνήσουμε αν αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να σχετίζεται με διαταραχές στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω της παραγωγής ενδοκυττάρων κυτοκινών. Πράγματι, μελετήσαμε την ενδοκυττάρια σύνθεση των κυτοκινών IL-6 και IL-1 β στα μονοκύτταρα χρησιμοποιώντας ως διεγέρτη των μονοκυττάρων τον συνθετικό συνδέτη Pam3CSK4, το κύριο πρόσδεμα του TLR2. Η παραγωγή κυτοκινών μελετήθηκε μέσω κυτταρομετρία ροής παρουσία και απουσία των συνδετών.

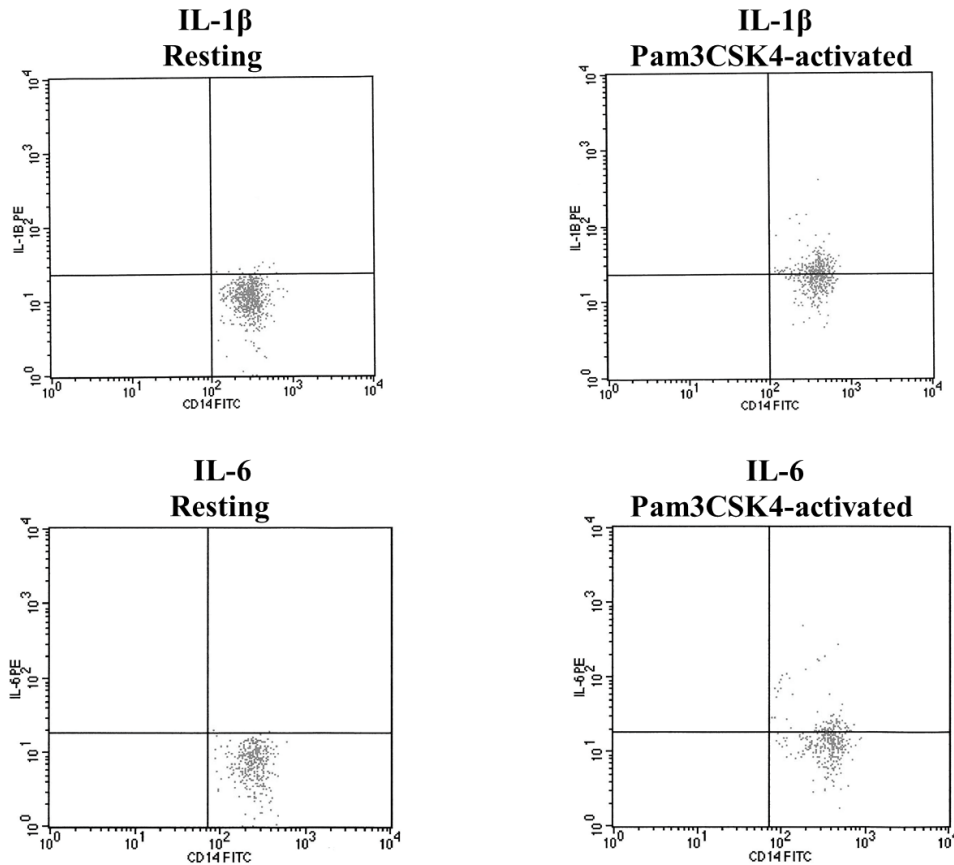
Ταυτοποιήσαμε τα μονοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής με βάση την έκφραση του CD14 (γενικός δείκτης μονοκυττάρων). Όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα ο πληθυσμός των μονοκυττάρων εκφράζει θετικότητα για το CD14+ (εικόνα 14).



Εικόνα 14. Ταυτοποίηση των μονοκυττάρων σε ολικό πληθυσμό μονοκυττάρων παρουσία του CD14+ μέσω κυτταρομετρία ροής

Για να βρούμε την βέλτιστη συγκέντρωση του Pam3CSK4 για τη διέγερση των κυτοκινών πραγματοποιήσαμε αρχικά πειράματα σε φυσιολογικά κύτταρα. Οι συγκεντρώσεις του Pam3CSK4 που χρησιμοποιήσαμε ήταν 0.1μg/mL και 1μg/mL και 3μg/mL. Παρατηρήσαμε ότι χρησιμοποιώντας τη μεγαλύτερη συγκέντρωση Pam3CSK4, η έκφραση των κυτοκινών αυξάνει σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τις μικρότερες συγκεντρώσεις. Για το λόγο αυτό η συγκέντρωση που χρησιμοποιήσαμε για τη διέγερση των μονοκυττάρων ήταν 3μg/mL.

Στη συνέχεια, αναλύσαμε τα δείγματα μας με βάση την έκφρασή τους στο CD14+ και στην IL-6 ή την IL-1β. Μετά την ενεργοποίηση με τον Pam3CSK4 (εικόνα 15) υπήρχε ένας πληθυσμός που ήταν θετικός τόσο για το CD14+ όσο και για την IL-6 ή την IL-1β. Παρατηρήθηκε ότι, η μέση ένταση φθορισμού των μονοκυττάρων που εκφράζουν τόσο το CD14+ όσο και την IL-6 ή την IL-1β (η περιοχή που είναι πάνω δεξιά στο ιστόγραμμα) αυξάνεται όταν προστεθεί ο συνδέτης. Προφανώς η παρουσία του, διεγείρει το κύτταρο να ανταποκριθεί στο ερέθισμα αυξάνοντας τις πορείες σηματοδότησης για την ενδοκυττάρια παραγωγή κυτοκινών. Στα μη διεγερμένα μονοκύτταρα τα επίπεδα έκφρασης των ιντερλευκινών είναι χαμηλότερα (πίνακας 12) σε σχέση με τα διεγερμένα μονοκύτταρα.



Εικόνα 15. Αντιπροσωπευτικές κυτταρομετρικές εικόνες της ενδοκυττάριας παραγωγής της IL-6 σε μη διεγερμένα και διεγερμένα με Pam3CSK4 μονοκύτταρα, και της IL-1β σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα και σε διεγερμένα με Pam3CSK4 μονοκύτταρα στην ομάδα 1.

Συγκρίνοντας τις ομάδες της μελέτης, τα ενδοκυττάρια επίπεδα των IL-1β και IL-6 στα μη διεγερμένα μονοκύτταρα ήταν χαμηλότερα στην ομάδα 1 σε σχέση με την ομάδα 2 και την ομάδα ελέγχου, ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα 2 και την ομάδα ελέγχου (πίνακας 12). Μετά την ενεργοποίηση με τον συνδέτη Pam3CSK4 τα επίπεδα και των δύο κυτοκινών παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα των μη διεγερμένων κυττάρων. Ωστόσο, τα επίπεδα των κυτοκινών ήταν χαμηλότερα στην ομάδα 1 σε σχέση με την ομάδα 2 και την ομάδα ελέγχου, ενώ η ομάδα 2 εμφάνισε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στον πίνακα 12 απεικονίζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα.

Πίνακας 12. Ενδοκυττάρια επίπεδα των κυτοκινών IL-6 και IL-1β στα μονοκύτταρα πριν και μετά την διέγερση με τον Pam3CSK4

	Ομάδα ελέγχου		Ομάδα 1 (XNN ομάδα)		Ομάδα 2 (ΔN ομάδα)	
	Resting	Stimulated	Resting	Stimulated	Resting	Stimulated
IL-1β (MFI)	29±13	36±11*	17±9 [#]	26±11* ^{,\$}	28±7	47±15* ^{,\$}
IL-1β ⁺ /CD14 ⁺ (%)	16±3	28±9*	10±3 [#]	19±4* ^{,\$}	15±3	48±10* ^{,\$}
IL-6 (MFI)	18±8	22±7*	12±5 [#]	17±4* ^{,\$}	19±7	30±9* ^{,\$}
IL-6 ⁺ /CD14 ⁺ (%)	8±2	25±3*	5±1 [#]	16±5* ^{,\$}	8±3	35±9* ^{,\$}

Οι τιμές εκφράζονται ως mean± SD. *p<0.001 σε σχέση με τα μη διεγερμένα κύτταρα της ίδιας ομάδας, [#]p<0.01 σε σχέση με τα μη διεγερμένα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ή της ομάδας 2, ^{\$}p<0.05 σε σχέση με τα διεγερμένα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ή της ομάδας 2 και [§]p<0.05 σε σχέση με τα διεγερμένα κύτταρα της ομάδας ελέγχου

7.4. Προσδιορισμός κυτοκινών στον ορό

Σε συνέχεια των πειραμάτων μας θελήσαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα των κυτοκινών στον ορό με τη μέθοδο της πολλαπλής χαρτογράφησης (xMAP). Προσδιορίσαμε τόσο τις κυτοκίνες IL-1β και IL-6 που προσδιορίσαμε ενδοκυτταρίως καθώς και άλλες 25 φλεγμονώδεις πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, οι 27 φλεγμονώδεις πρωτεΐνες αποτελούνταν από 15 κυτοκίνες, 7 χυμοκίνες και 5 αυξητικούς παράγοντες (πίνακας 13). Χρησιμοποιήσαμε ένα νέο όργανο το Bio-Plex 200 χάρη στο οποίο με τη χρήση μικροσφαιριδίων, όπως περιγράφηκε εκτενώς παραπάνω, προσδιορίζεται ένας μεγάλος αριθμός αναλυτέων ουσιών. Η τεχνική αυτή είναι ικανή να πραγματοποιήσει μέχρι 100 προσδιορισμούς σε ένα μόνο δείγμα σε αντίθεση με την μέθοδο ELISA όπου σε ένα δείγμα μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο ένας προσδιορισμός.

Πίνακας 13. 27 Φλεγμονώδεις πρωτεΐνες

Κυτοκίνες	Χυμοκίνες	Αυξητικοί παράγοντες
Interleukine-1b (IL-1b)	Interleukine-8 (IL-8)	Fibroblast growth factors (FGF)
Interleukine-1ra (IL-1ra)	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)
Interleukine-2 (IL-2)	Macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α)	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)
Interleukine-4 (IL-4)	Macrophage inflammatory protein-1b (MIP-1b)	Platelet-derived growth factor (PDGF)
Interleukine-5 (IL-5)	EOTAXINE	Vascular endothelial growth factor (VEGF)
Interleukine-6 (IL-6)	RANTES	
Interleukine-7 (IL-7)	Induced protein-10 (IP-10)	
Interleukine-9 (IL-9)		
Interleukine-10 (IL-10)		
Interleukine-12 (IL-12)		
Interleukine-13 (IL-13)		
Interleukine-15 (IL-15)		
Interleukine-17 (IL-17)		
Tumor necrosis factor (TNF-α)		
Interferon-γ (INF-γ)		

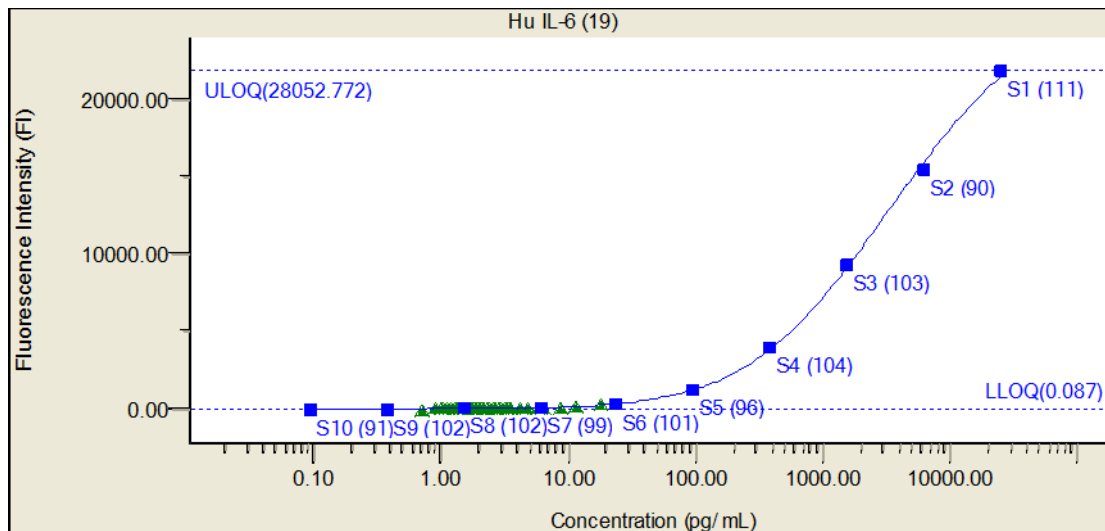
Τα επίπεδα των φλεγμονωδών πρωτεϊνών συνοψίζονται στον πίνακα 14. Τα επίπεδα των IL-2, IL-15 και GM-CSF ήταν μη ανιχνεύσιμα επειδή οι τιμές τους ήταν εκτός των τιμών αναφοράς στις πρότυπες καμπύλες. Ανάμεσα στις υπόλοιπες μετρούμενες πρωτεΐνες, τα επίπεδα των IL-6 και IP-10 ήταν αυξημένα στην ομάδα 1 και στην ομάδα 2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$). Οι IL-4 και MCP-1 ήταν μειωμένες και στις δύο ομάδες των ασθενών σε σχέση με τους υγιείς ($p < 0.05$). Τα επίπεδα της IL-17 ήταν μειωμένα στην ομάδα 2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.001$) και με την ομάδα με την ομάδα 1 ($p < 0.05$). Ο G-CSF ήταν μειωμένος στην ομάδα 1 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.001$), ενώ ο PDGF ήταν μειωμένος στην ομάδα 2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για τους φλεγμονώδεις παράγοντες IL-1ra, IL-5, IL7, IL8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, eotaxine, FGF, INF-γ, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, TNF-α και VEGF ανάμεσα στις εξεταζόμενες ομάδες. Οι μετρήσεις των επιπέδων των φλεγμονωδών παραγόντων εκφράστηκαν σε pg/mL. Στην εικόνα 16 παραθέτουμε ενδεικτικά την πρότυπη καμπύλη στην οποία απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις της IL-6 των δειγμάτων, τις οποίες λαμβάνουμε με τη μέθοδο της πολλαπλής χαρτογράφησης.

Πίνακας 14. Επίπεδα κυτοκινών στον ορό μετρούμενα με τη μέθοδο της πολλαπλής χαρτογράφησης

Παράμετροι	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα 1	Ομάδα 2
IL-1b	1.5(1- 2.1)	1.4(0.7-2.7)	1.4 (0.6-9.1)
IL-1ra	136(76-259)	134(37-379)	151(58-399)
IL-2	ND	ND	ND
IL-4	10.85(8.2-14.8)	9.5(6.8-16.2)*	9.14(1.5-12.5)*
IL-5	1.7(1.3-2.8)	1.8(0.8-3.1)	1.9(0.9-3.9)
IL-6	6.8(4.16-9.8)	12.1(3.7-46.3)*	13.2(5.1-62)*
IL-7	6.08(3.6-11.7)	5.8(2.8-11.9)	5.6(2.37-14.9)
IL-8	16.6(10.8-59)	19(8.8-70)	17(10.2-49)
IL-9	31.4(19-52)	30.5(14-58)	28(12.4-78)
IL-10	2.35(0.7-5.9)	2.5(0.63-5.7)	2.8(1.28-8.9)
IL-12	27.3(5.9-89.8)	34.4(12.1-135)	29.9(12.2-113)
IL-13	4.5(1.58-9.5)	4.7(2.4-12.7)	4.9(2.76-17)
IL-15	ND	ND	ND
IL-17	63(43.7-121)	59.3(29.7-158)	49(16.2-93.4) ^{#§}
Eotaxine	153(63-373)	148(25-348)	157(65-422)
FGF	16.1(6.2-33.3)	13.5(2.8-43)	14.3(2.14-99)
G-CSF	28.1(19.4-50)	21.4(10.6-38) [#]	26.4(10.4-49)
GM-CSF	ND	ND	ND
INF-γ	35.4(21-51)	37.6(10.3-88)	39(22-79)
IP-10	670(189-188)	1165(302-4386)*	1235(295-4504)*
MCP-1	44.5(23.3-127)	32.1(8.1-96)*	34.6(14-108)*
MIP-1a	4.35(2.7-8.3)	4.9(1.22-12.2)	4.29(1.61-12.2)
PDGF-BB	9628(5159-19526)	8604(2759-25280)	6317(2217-13570) ^{#§}
MIP-1b	99.6(36.7-184)	105(19.6-247)	103.7(19.2-286)
RANTES	3417(2723-4746)	3553(2191-5045)	3214(2222-4638)
TNF-a	11.35(4.4-32.8)	14.9(9.7-50)	16.2(8.7-88)
VEGF	123(20-443)	131(18.5-513)	140(35-613)

*p<0.05 σε σχέση ομάδα ελέγχου, #p<0.001 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και

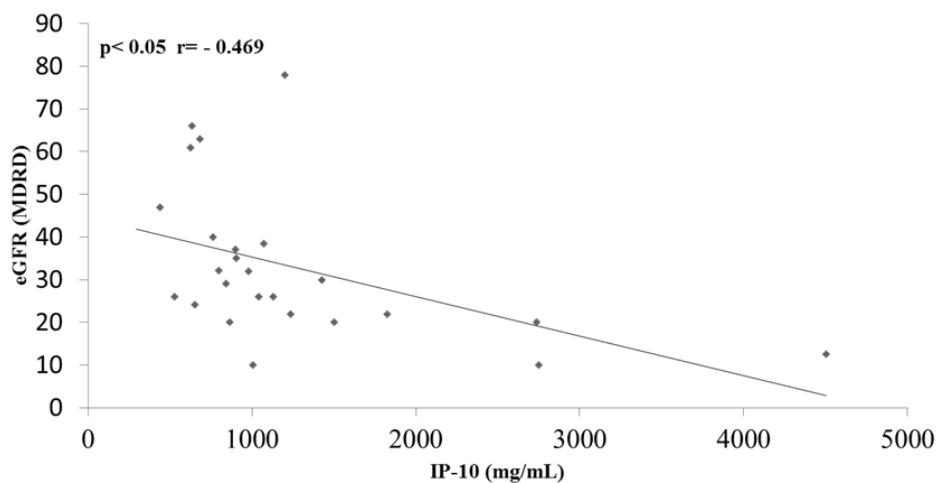
§p<0.05 σε σχέση με την ομάδα 1



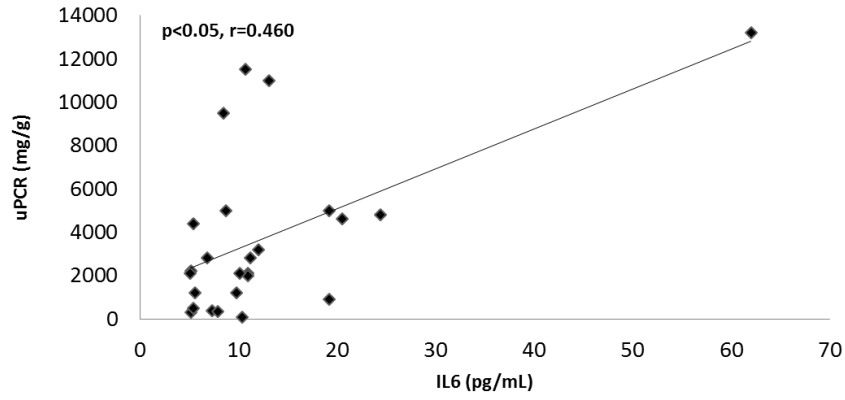
Εικόνα 16. Πρότυπη καμπύλη στην οποία απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

7.4.1. Συσχετίσεις των φλεγμονωδών πρωτεϊνών

Η χυμοκίνη IP-10 συσχετίστηκε αρνητικά με eGFR (MDRD) στους ασθενείς της ομάδας 2 ($p < 0.05$, $r = -0.469$) (εικόνα 17). Η ιντερλευκίνη IL-6 συσχετίστηκε θετικά με την απέκκριση πρωτεΐνης, όπως αυτή εκφράστηκε ως λόγος πρωτεΐνη/κρεατίνη (uPCR) ($p < 0.05$, $r = 0.460$) (εικόνα 18) στην ομάδα 2.



Εικόνα 17. Αρνητική συσχέτιση του IP-10 με την eGFR (MDRD) στους ασθενείς της ομάδας 2



Εικόνα 18. Συσχέτιση της IL-6 με τον λόγο πρωτεΐνη/κρεατινίνης στα ούρα σε ασθενείς της ομάδας 2

Κεφάλαιο 8. Συζήτηση

8.1. Μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 και ενδοκυττάρια σύνθεση κυτοκινών

Η φλεγμονή είναι κοινά αποδεκτό ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ΧΝΝ συμβάλλοντας σημαντικά στη νοσηρότητα και τη θνητότητα της νόσου [234]. Επίσης, έρευνες έχουν δείξει ότι η ουραιμία συνδέεται με μια κατάσταση ανοσολογικής δυσλειτουργίας, η οποία χαρακτηρίζεται από διαταραχές τόσο της φυσικής όσο και της ειδικής ανοσίας, δημιουργώντας μια πολύπλοκη και μη καλά κατανοητή έως σήμερα διαταραχή. Η δυσλειτουργία αυτή συμβάλει στην αυξημένη επίπτωση των λοιμώξεων που παρατηρείται στους ασθενείς με ΧΝΝ [230, 226]. Επίσης, η ΔΝ είναι η κύρια αιτία της ΧΝΝΤΣ στις αναπτυγμένες χώρες [235] και ενώ παραδοσιακά θεωρούνταν μια μη ανοσολογική νόσος, νέες ενδείξεις υποδηλώνουν ότι φλεγμονώδεις και ανοσολογικοί μηχανισμοί πιθανά διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια και την εξέλιξη της νόσου [236,125].

Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες κατέχουν πρωταρχικό ρόλο στην επαγωγή φυσικής ανοσολογικής απάντησης, ενεργοποιώντας προφλεγμονώδη σηματοδοτικά μονοπάτια σε απάντηση διαφόρων μικροβιακών παθογόνων [230, 220]. Επίσης, μέσω της ενεργοποίησης των μορίων μη μικροβιακής αιτιολογίας (πρωτεΐνες θερμικού σοκ, κλάσματα της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας) [191,220], οι TLRs εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις μη λοιμώδους αιτιολογίας [191]. Διάφορες κλινικές και πειραματικές μελέτες εμπλέκουν τους TLR2 και TLR4 στην παθογένεια της οξείας νεφρικής βλάβης [203], της νεφρικής βλάβης εξ' ισχαιμίας /επαναιμάτωσης [223,224] και της οξείας απόρριψης μοσχεύματος [214-217], ενώ οι TLR3, 7 και 9 σχετίζονται με την παθογένεια των σπειραματονεφρίτιδων [207-210], παρέχοντας πειστικές ενδείξεις όσον αφορά το ρόλο των TLRs στις νεφρικές νόσους. Συνδέονται με ειδικούς συνδέτες και μέσω της ενεργοποίησης του NF-κβ, επάγουν την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτοκινών, (όπως οι IL-1β, IL-6, TNF-α), οδηγώντας στη συστηματική φλεγμονή στον ξενιστή [193,194, 220,226].

Όπως προαναφέρθηκε, στοιχεία από πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η σηματοδότηση μέσω των TLR2 και TLR4 εμπλέκεται στην παθογένεια τόσο των ασθενών υπό αιμοκάθαρση, όσο και των ασθενών με ΧΝΝ πιο πρώιμων σταδίων. Παρόλα αυτά τα στοιχεία, κυρίως στους μη αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς είναι περιορισμένα [230,237], ενώ τα υπάρχοντα στοιχεία σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς είναι αντικρουόμενα [227,228]. Επιπλέον, κλινικές μελέτες έδειξαν αυξημένη έκφραση των υποδοχέων TLR2 και TLR4 στα μονοκύτταρα ασθενών με ΣΔ τύπου 1 και 2 [238,239]. Ωστόσο, η συμβολή των TLRs στη φλεγμονώδη διαδικασία της ΔΝ παραμένει άγνωστη. Μια πρόσφατη in vitro μελέτη έδειξε αύξηση της TLR4 έκφρασης στα νεφρικά σωληνάκια ανθρώπινων νεφρών με ΔΝ [232]. Από όσο γνωρίζουμε με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την έκφραση αυτών των υποδοχέων σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με ΔΝ. Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε για να μελετήσει τη βλάβη της φυσικής ανοσίας που

σχετίζεται με την ανώμαλη έκφραση των υποδοχέων TLR2 και TLR4 και την τοπική απάντηση των κυτοκινών μετά την ενεργοποίηση με τους συνδέτες Pam3CSK4 σε ασθενείς με XNN με ή χωρίς ΔΝ.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, έδειξαν στατιστικά σημαντικά αυξημένη έκφραση (η οποία εκφράστηκε ως μέση ένταση φθορισμού, (MFI)), και των δύο υποδοχέων μετά τη διέγερση με τον συνδέτη σε όλο τον πληθυσμό της μελέτης. Αξίζει να αναφέρουμε ότι παρατηρήσαμε αύξηση της έκφρασης του TLR4 μετά τη διέγερση με τον Pam3CSK4, αν και το συγκεκριμένο λιποπεπτίδιο δεν είναι ο κλασικός συνδέτης του υποδοχέα TLR4. Βρήκαμε ότι η μεμβρανική έκφραση του TLR2 σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα ασθενών με XNN είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου και ότι ο TLR2 αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα της hsCRP. Αντίθετα, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε για τον υποδοχέα TLR4. Τα αποτελέσματα μας είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Koc et al [237], αλλά αντίθετα σε σχέση με αυτά του Ando et al, ο οποίος έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση στην έκφραση του υποδοχέα TLR4 στους ασθενείς με XNN σε σχέση με τους υγιείς [230]. Ο λόγος αυτής ασυμφωνίας δεν είναι ξεκάθαρος. Ωστόσο, θα μπορούσε να αποδοθεί, μερικώς τουλάχιστον, στη διαφορετική εθνότητα των εξεταζόμενων πληθυσμών, στο διαφορετικό επίπεδο νεφρικής λειτουργίας αφού οι ασθενείς στην μελέτη του Ando ήταν σε πιο προχωρημένο στάδιο νεφρικής λειτουργίας σε σχέση με τους ασθενείς μας και τέλος στο γεγονός ότι η θεραπεία με στατίνη αποτέλεσε κριτήριο αποκλεισμού για τη μελέτη μας, ενώ κάτι τέτοιο δεν αναφέρεται για τη μελέτη του Ando. Πράγματι, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι στατίνες μειώνουν σημαντικά την έκφραση του TLR4 και τη σηματοδότηση μέσω του συγκεκριμένου υποδοχέα σε ανθρώπινα CD14+ μονοκύτταρα υπονοώντας αλληλεπίδραση του φαρμάκου με τη φυσική ανοσία, ως μία από τις πλειοτροπικές του δράσεις [240, 241]. Για το λόγο αυτό η θεραπεία με στατίνη θεωρήθηκε κριτήριο αποκλεισμού για τη μελέτη μας. Η αύξηση της έκφρασης του TLR2 σε διεγερμένα και μη μονοκύτταρα στην ομάδα ασθενών με XNN και όχι του TLR4, καθώς επίσης και η θετική συσχέτισή του με την hsCRP, υποδηλώνει ότι ο TLR2, και όχι ο TLR4, εμπλέκεται στη χρόνια χαμηλού βαθμού φλεγμονή που οξύνει τις αρνητικές επιδράσεις των διεγερμένων μονοκυττάρων. Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του TLR2 και της χαμηλού βαθμού φλεγμονής στη XNN θα μπορούσε να συσχετίζεται με διάφορους παράγοντες όπως η κατακράτηση ουραιμικών τοξινών, η χρόνια διέγερση από την αγγειοτενσίνη II, η μειωμένη ικανότητα κάθαρσης των ενδοτοξινών και η αυξημένη εντερική διαπερατότητα στις ενδοτοξίνες κυρίως σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου [242,243].

Μια προφλεγμονώδης κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα κυκλοφορούντων φλεγμονωδών παραγόντων και αυξημένη δραστηριότητα μονοκυττάρων, είναι επίσης χαρακτηριστικό των ασθενών με ΔΝ [124, 125, 236]. Πειραματικές μελέτες σε ποντίκια με ΔΝ επαγόμενη με στρεπτοζοσίνη έδειξαν αυξημένη έκφραση του TLR2 [231] και του TLR4 [244]. Επιπλέον, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα από κλινικές in vitro μελέτες που υποστηρίζουν έντονη έκφραση των TLR2 [231] και TLR4 [232] σε σπειράματα και σωληναριοδιάμεσο ιστό σε βιοψίες νεφρού ασθενών με ΔΝ. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι όπως η ομάδα

των ασθενών με ΧΝΝ, έτσι και η ομάδα ασθενών με ΔΝ, είχε αυξημένη έκφραση του TLR2 υποδοχέα στα διεγερμένα και στα μη διεγερμένα μονοκύτταρα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα TLR4 στους ασθενείς με ΔΝ, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα των ασθενών με ΧΝΝ. Επίσης, η έκφραση του TLR4 συσχετίστηκε με την hsCRP στην ομάδα των ασθενών με ΔΝ και όχι στην ομάδα των ασθενών με ΧΝΝ. Οι παραπάνω παρατηρήσεις προτείνουν ένα πιθανό ρόλο του συγκεκριμένου υποδοχέα στη χρόνια φλεγμονή ασθενών με ΔΝ. Στη σταδιακή πολλαπλή παλινδρόμηση τόσο ο TLR2 όσο ο TLR4 ήταν ανεξάρτητοι καθοριστικοί παράγοντες της hsCRP υποδεικνύοντας ότι οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να αποτελέσουν προγνωστικούς παράγοντες της φλεγμονής. Παρατηρήσαμε επίσης θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης και των δύο υποδοχέων TLR2 και TLR4 με τα επίπεδα γλυκόζης ορού και της HbA1c, το οποίο θα μπορούσε να υποδηλώσει ένα σημαντικό ρόλο της υπεργλυκαιμίας και της αντίστασης της ινσουλίνης στην ανοσολογική προέλευση της νόσου. Πράγματι, η ινσουλίνη έχει κατασταλτική επίδραση στην έκφραση και των δύο υποδοχέων, ενώ έρευνες έχουν δείξει ότι οι διαβητικοί ασθενείς έχουν αυξημένη TLR2 και TLR4 έκφραση στα μονοκύτταρα [238,239,244,245]. Επιπλέον οι παραπάνω συσχετίσεις υποδηλώνουν ότι ο φτωχός γλυκαιμικός έλεγχος συνδέεται με την επικράτηση της φλεγμονής, κάτι που συμφωνεί με παρόμοιες μελέτες σε ασθενείς με ΣΔτ2 [239]. Σε συμφωνία με την αυτή την παρατήρηση, διάφορες έρευνες αποκάλυψαν ότι ο TLR4 συμβάλει στην ανάπτυξη της φλεγμονής και την αντίσταση στην ινσουλίνη μέσω της διέγερσής του από αυξημένους εξωγενείς (διαιτητικά λιπαρά οξέα) και ενδογενείς (ελεύθερα λιπαρά οξέα) συνδέτες [246]. Επιπρόσθετα, η συσχέτιση μεταξύ TLR4 και πρωτεϊνουρίας, θα μπορούσε να υποδηλώσει μια πιθανή οδό μεσολαβούμενη από τον TLR4 για την εξέλιξη της ΔΝ, εφόσον η πρωτεϊνουρία θεωρείται δείκτης σοβαρότητας της νόσου που πιθανά συνεισφέρει στη νεφρική βλάβη.

Η έρευνά μας επίσης επικεντρώθηκε στη μελέτη της σύνθεσης των ενδοκυττάρων προφλεγμονωδών κυτοκινών IL-1 β και IL-6 πριν και μετά τη διέγερση με τον συνδέτη του TLR2, το συνθετικό πολυπεπτίδιο Pam3CSK4. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι ανάλογα πειράματα έγιναν από το εργαστήριό μας στις ίδιες ομάδες ασθενών, σε μικρότερο ωστόσο πληθυσμό (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), όπου μελετήθηκε η σύνθεση των συγκεκριμένων κυτοκινών χρησιμοποιώντας ωστόσο διαφορετικό συνδέτη για την ενεργοποίησή τους, τον συνδέτη του TLR4, τον λιποπολυσακχαρίτη LPS. Μελετώντας λοιπόν συνολικά τα αποτελέσματα, δείξαμε ότι τα ενδοκυττάρια επίπεδα των κυτοκινών πριν και μετά τη διέγερση και με τους δύο συνδέτες ήταν μειωμένα στην ομάδα των ασθενών με ΧΝΝ. Τα ευρήματά μας είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης του Ando et al, όπου η διέγερση των κυτοκινών έγινε με τον LPS [230]. Επομένως, θα μπορούσαμε να προτείνουμε ότι οι ασθενείς με ΧΝΝ, χωρίς την παρουσία του ΣΔ, παρά την αυξημένη έκφραση του TLR2 που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας, επιδεικνύουν μια ανωμαλία στην οδό σηματοδότησης μέσω του TLR2 που οδηγεί στην επαγωγή της σύνθεσης των κυτοκινών στα μονοκύτταρα. Παρόλα αυτά, η υπόθεση αυτή πρέπει να αποδειχθεί σε μελλοντικές ειδικά σχεδιασμένες μελέτες. Η ανεπαρκής παραγωγή των

προφλεγμονωδών κυτοκινών στα μονοκύτταρα ασθενών με ΧΝΝ, θα μπορούσε τουλάχιστον μερικώς, να συμβάλλει στην αυξημένη επίπτωση των λοιμώξεων που παρατηρούνται σε ασθενείς με ΧΝΝ [230,247]. Αντίθετα, στην ομάδα των ασθενών με ΔΝ, η διέγερση με τον Pam3CSK4 οδήγησε σε αύξηση της σύνθεσης των ενδοκυττάρων κυτοκινών. Τα αυξημένα επίπεδα κυτοκινών στην ηρεμία και μετά την διέγερση με τον συνδέτη στην ομάδα της ΔΝ σε σχέση με την ομάδα της ΧΝΝ, θα μπορούσε να υποδηλώσει μια έντονη φλεγμονώδη διαδικασία η οποία υπερνικά τη διαταραχή μεταγωγής του σήματος που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με ΧΝΝ και θα μπορούσε να αποδοθεί στην υπεργλυκαιμία. Αντίθετα, στα πειράματα που έγιναν με τον LPS, παρατηρήθηκε μείωση των κυτοκινών. Βλέπουμε λοιπόν ότι οι ασθενείς της ομάδας με τη ΔΝ έδειξαν μια μη αναμενόμενη διαφορετική συμπεριφορά στα επίπεδα των ενδοκυττάρων κυτοκινών στους δυο διαφορετικούς συνδέτες. Έτσι λοιπόν παρά τη στατιστικά σημαντική υπερέκφραση των υποδοχέων TLR2 και TLR4 στα μονοκύτταρα των ασθενών με ΔΝ, αυξημένη παραγωγή κυτοκινών παρατηρήθηκε μόνο με τον συνδέτη του TLR2 Pam3CSK4 και όχι με τον συνδέτη του TLR4 LPS. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι πιθανά τα σηματοδοτικά μονοπάτια των TLR2 και TLR4 ενδέχεται να επηρεαστούν διαφορετικά από τη νοσολογική οντότητα της ΔΝ. Περαιτέρω έρευνες είναι απαραίτητες ώστε να γίνει κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο συμβάλουν οι υποδοχείς αυτοί και συγκεκριμένα ο TLR4 στη διαδικασία της φλεγμονής στη ΔΝ. Ωστόσο, δεν καταφέραμε να δείξουμε συσχέτιση ανάμεσα στη μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 και στη διαταραχή της απόκρισης των κυτοκινών στο συνδέτη και στις δύο ομάδες των ασθενών, το οποίο μας οδηγεί να υποθέσουμε πως πιθανά άλλοι υποδοχείς και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια συμμετέχουν στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας παραγωγής κυτοκινών.

Όπως προαναφέραμε, βρήκαμε συσχέτιση ανάμεσα στους TLRs και την hsCRP και στις δύο ομάδες των ασθενών ενισχύοντας πιθανά το φλεγμονώδη ρόλο αυτών των υποδοχέων στη ΧΝΝ και τη ΔΝ. Ωστόσο, όπως γνωρίζουμε η πρωτεΐνη hsCRP έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί ως δείκτης καρδιαγγειακού ρίσκου, ενώ όλο και περισσότερα στοιχεία υποστηρίζουν τη συμμετοχή του TLR2 και κυρίως του TLR4 ως μεσολαβητή της αθηρογένεσης [248]. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας σε μια σχετικά πρόσφατη μελέτη ο Lorenzen et al, βρήκε θετική συσχέτιση του TLR4 και της hsCRP σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, αλλά απέτυχε να βρει μια σχέση ανάμεσα στην έκφραση του TLR4 και μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάματα [249]. Περαιτέρω έρευνες είναι απαραίτητες ώστε να ξεκαθαριστεί ο πιθανός ρόλος των TLRs στην αθηρογένεση και στην καρδιαγγειακή νόσο στους ασθενείς με ΧΝΝ.

8.2. Προσδιορισμός των κυτοκινών στον ορό

Η έρευνα μας επίσης επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό φλεγμονωδών πρωτεϊνών στον ορό και εκτός από τις IL-1β και IL-6 τα επίπεδα των οποίων προσδιορίστηκαν ενδοκυτταρίως, μετρήσαμε τα επίπεδα 25 άλλων παραγόντων. Η επικρατούσα θεωρία για το μηχανισμό της φλεγμονής στη ΧΝΝ προτείνει την ελαττωματική κάθαρση πολλών κυτοκινών μέσω του τραυματισμένου νεφρού, επειδή ο νεφρός είναι υπεύθυνος για την αποβολή αυτών των κυτοκινών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της ευαίσθητης ισορροπίας των προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1, IL-6 και TNF-α, και των αναστολέων τους (αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες) (IL-4, IL-10 και IL-13) [250]. Ο στόχος της μελέτης μας ήταν να προσπαθήσουμε να περιγράψουμε καλύτερα τη συμβολή της φλεγμονής στη νεφρική βλάβη μέσω της ταυτόχρονης μέτρησης φλεγμονωδών παραγόντων με τις ίδιες συνθήκες αναλυτή και κατά πόσο διαγνωστικά μπορούν να είναι τα αποτελέσματα. Η εφαρμογή της μεθόδου της πολλαπλής χαρτογράφησης, όπως προαναφέρθηκε, είναι μια καινοτόμος τεχνολογία η οποία επιτρέπει το ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλαπλών δεικτών με τη χρήση ενός βιολογικού δείγματος, το οποίο μας επιτρέπει να αξιολογήσουμε την προγνωστική τους αξία συγκριτικά και όχι ξεχωριστά.

Από τις 15 κυτοκίνες που μετρήσαμε, μόνο η IL-6 ήταν αυξημένη τόσο στους ασθενείς με ΧΝΝ όσο και στους ασθενείς με ΔΝ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η IL-6 έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης συστηματικής φλεγμονής στη ΧΝΝΤΣ [251], ενώ μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι υπάρχει ανεξάρτητη συσχέτιση με το στάδιο της νεφρικής νόσου [252]. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά προηγούμενων ερευνών όπου ασθενείς με ΔΝ εμφάνισαν υψηλά επίπεδα IL-6 ορού [253,254]. Επίσης, η συσχέτιση της IL-6 με την πρωτεϊνουρία στην ομάδα της ΔΝ που παρατηρήσαμε συνάδουν με τα αποτελέσματα μιας έρευνας in vitro σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με ΔΝ, όπου η mRNA έκφραση της IL-6 σε νεφρικά φλοιϊκά κύτταρα συσχετίστηκε με την πρωτεϊνουρία [255]. Οι παραπάνω παρατηρήσεις μας οδηγούν στην υπόθεση ότι η IL-6 πιθανά παίζει κάποιο ρόλο στη νεφρική βλάβη από το διαβήτη.

Η IL-4 είναι μια άλλη πρωτεΐνη από την ομάδα των κυτοκινών που εμφάνισε μειωμένα επίπεδα και στις δύο ομάδες ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Μια πρόσφατη κλινική μελέτη σε μεγάλο Ιαπωνικό πληθυσμό με ΧΝΝ μελέτησε πολυμορφισμούς και παρατήρησε ότι οι ασθενείς με ομόζυγο παραλλαγή της IL-4-3CC, που είναι ένας γονότυπος με αυξημένη παραγωγή IL-4, παρουσίασαν μικρότερη επίπτωση της ΧΝΝ [256]. Το παραπάνω εύρημα σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα IL-4 που βρήκαμε και στις δύο ομάδες με ΧΝΝ, θα μπορούσε να οδηγήσει στην υπόθεση ότι η IL-4 έχει ένα προστατευτικό ρόλο στη νεφρική λειτουργία, ενώ τα μειωμένα επίπεδά της θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον ως δείκτης νεφρικής βλάβης. Επίσης βρήκαμε μειωμένα επίπεδα της IL-17 στην ομάδα των ασθενών με ΔΝ σε σχέση με τις άλλες δύο εξεταζόμενες ομάδες, επιβεβαιώνοντας εν μέρει τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης μελέτης, η οποία έδειξε μειωμένα επίπεδα της IL-17 σε ασθενείς με ΔΝ και αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με ΣΔΤ2, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [257]. Πρόκειται για μια κυτοκίνη η οποία

μπορεί να προάγει φλεγμονή στο νεφρό εν μέρει με την αύξηση της έκφρασης του TNF- α , και στη συνέχεια ενεργοποίηση χυμοκινών που οδηγούν σε εισβολή ανοσιακών κυττάρων στο νεφρό [258]. Έχει συσχετισθεί με διάφορες ανοσολογικές νόσους καθώς και αυτοάνοσες νεφρίτιδες, ο ρόλος της όμως στην ΧΝΝ και κυρίως στη ΔΝ δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Μια κλινική έρευνα βρήκε αυξημένα επίπεδα της ορμόνης στα ούρα ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο λόγω νόσου ελαχίστων αλλοιώσεων, και θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της και της πρωτεϊνουρίας, καταλήγοντας ότι η απέκκριση της IL-17 στα ούρα πιθανά αντανάκλαει την ενεργότητα του νεφρωσικού συνδρόμου [259]. Με βάσει τα παραπάνω, τα μειωμένα επίπεδα ορού της IL-17 στους ασθενείς με ΔΝ, που βρήκαμε στην έρευνά μας, θα μπορούσαν να οφείλονται στην αυξημένη απέκκριση της κυτοκίνης στα ούρα αν και δεν κατορθώσαμε να δείξουμε συσχέτιση της πρωτεϊνουρίας με τα μειωμένα επίπεδα της ορμόνης. Η ταυτόχρονη μέτρηση των επιπέδων IL-17 στα ούρα και το αίμα θα μπορούσε να βοηθήσει να κατανοήσουμε το μηχανισμό δράσης της στη ΔΝ.

Η μελέτη μας δεν διαπίστωσε, όπως θα ήταν αναμενόμενο, αυξημένα επίπεδα του TNF- α στην ομάδα με ΔΝ. Υπάρχουν δεδομένα από πειραματικές και κλινικές μελέτες που έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα του TNF- α στον ορό και τα ούρα σε ασθενείς με ΔΝ [151-154]. Κλινική μελέτη έδειξε σημαντική και ανεξάρτητη συσχέτιση μεταξύ επιπέδων TNF- α στα ούρα και πρωτεϊνουρία. Ωστόσο, δεν βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις της κυτοκίνης στον ορό και τα ούρα, πιθανολογώντας ενδονεφρική παραγωγή της κυτοκίνης [154]. Μια πολύ πρόσφατη κλινική μελέτη συνάδει με τα παραπάνω αποτελέσματα, όπου τα επίπεδα του TNF- α στα ούρα συσχετίστηκαν με την αλβουμινουρία και τη μείωση του GFR σε ασθενείς με ΣΔ, προτείνοντας τον TNF- α ούρων ως δείκτη εξέλιξης της ΔΝ στα πρώιμα στάδια [260]. Επιπλέον θα πρέπει να λάβουμε υπόψιν ότι πολλές από τις δράσεις των κυτοκινών είναι τοπικές και όχι συστηματικές και ένα σημαντικό ποσοστό αυτών των δράσεων είναι παράκρινες. Έτσι λοιπόν, η μέτρηση μερικών κυτοκινών στον ορό ενδέχεται να έχει περιορισμένη αξία [110].

Από τις χυμοκίνες που εξετάσαμε, παρατηρήσαμε επίσης, σημαντική αύξηση του IP-10 και στις δύο ομάδες των ασθενών όντας πιο έκδηλη στους ασθενείς με ΔΝ. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν προηγούμενες κλινικές μελέτες οι οποίες έδειξαν αυξημένα επίπεδα του IP-10 στον ορό και στα ούρα σε ασθενείς με ΔΝ [261,262]. Τα αυξημένα επίπεδα του IP-10 στους ασθενείς μας με ΧΝΝ χωρίς ΣΔ συμφωνούν με μια πρόσφατη μελέτη [263]. Η αρνητική συσχέτιση των επιπέδων του IP-10 με τον eGFR στην ομάδα των ασθενών με ΔΝ είναι ένα καινούργιο εύρημα, το οποίο θα μπορούσε να προτείνει τον IP-10 ως δείκτη εξέλιξης της νεφρικής βλάβης στη ΔΝ. Ωστόσο, αυτό είναι μια υπόθεση που θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με πιο στοχευμένες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό πληθυσμού. Αντιθέτως βρήκαμε μη αναμενόμενα μειωμένα επίπεδα του MCP-1 και στις δύο ομάδες των ασθενών σε σχέση με τους υγιείς, που έρχεται σε αντίθεση με την έρευνα του Mansouri et al σε ασθενείς με ΧΝΝ [263]. Η αντίφαση των αποτελεσμάτων μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι ασθενείς με ΧΝΝ ήταν προτελικού σταδίου (eGFR<20ml/min/1.73m²) ενώ οι ασθενείς μας ήταν όλων των σταδίων. Έχει βρεθεί ότι ο διαβήτης διεγείρει την παραγωγή της χυμοκίνης

από τα μεσαγγειακά κύτταρα [264]. Από τα υπάρχοντα δεδομένα τα επίπεδα του MCP-1 στα ούρα έχουν συσχετισθεί με τα επίπεδα πρωτεΐνουρίας και υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ΔΝ [158,265]. Όσον αφορά τα επίπεδα του MCP-1 ορού, τα στοιχεία είναι λιγότερο ξεκάθαρα. Έρευνα έδειξε ότι τα επίπεδα ορού της χυμοκίνης δεν ήταν αυξημένα στους ασθενείς με ΔΝ, ούτε συσχετίστηκαν με την πρωτεΐνουρία, ενώ η παραγωγή της από τα μεσαγγειακά κύτταρα φάνηκε να είναι αυτή που σχετίζεται με την έναρξη και την εξέλιξη της ΔΝ [265]. Φαίνεται λοιπόν ότι τα επίπεδα του MCP-1 στον ορό δεν αντανακλούν την ενδονεφρική παραγωγή της χυμοκίνης και είναι αμφίβολη η αξιοπιστία της μέτρησής της.

Τέλος, η ερευνά μας επικεντρώθηκε και στη μελέτη των αυξητικών παραγόντων. Ωστόσο, απέτυχε να δείξει σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις εξεταζόμενες ομάδες. Οι αυξητικοί παράγοντες διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στη διαδικασία της δημιουργίας της ίνωσης. Ωστόσο, ο ρόλος τους στη νεφρική ίνωση είναι ακόμα υπό διερεύνηση [178]. Ενώ τα αυξημένα επίπεδα του TGF-β έχουν προταθεί ως πιθανοί δείκτες της εξέλιξης της ΧΝΝ [163], ο ρόλος των άλλων αυξητικών παραγόντων παραμένει ασαφής [178]. Ο ρόλος του PDGF και των ισομορφών του έχει αρχίσει να γίνεται εμφανής. Όλα τα μέλη του PDGF συστήματος εκφράζονται σε νεφρικά κύτταρα και εμπλέκονται στις διαδικασίες διάμεσης ίνωσης, μεσαγγειοϋπερπλαστικών διαταραχών και πειραματικής αγγειογένεσης, ενώ ενδογενείς αναστολές του PDGF θεωρούνται πιθανοί ενδογενείς θεραπευτικοί στόχοι [266]. Στοιχεία από πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η ισομορφή PDGF-BB μπορεί να προάγει τη δημιουργία ίνωσης σε ποντίκια [267]. Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα PDGF-BB στα ούρα θα μπορούσαν να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην έναρξη και την εξέλιξη της ΔΝ [268]. Επίσης, στοιχεία από μια έρευνα *in vitro* σε ανθρώπινες βιοψίες νεφρού με ΔΝ, έδειξε αυξημένη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση του PDGF, υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο του παράγοντα αυτού στη διαδικασία της νεφρικής ίνωσης [269]. Τα μειωμένα επίπεδα του PDGF-BB στον ορό των ασθενών με ΔΝ της μελέτης μας, είναι ένα καινούργιο εύρημα το οποίο μπορεί να οφείλεται σε ενδονεφρική διέγερση της αύξησής του.

Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, προτείνεται ότι οι TLR2 και TLR4 εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο στα μονοκύτταρα ασθενών με ΧΝΝ και ΔΝ, φαινόμενο το οποίο επηρεάζεται από την παρουσία του διαβήτη και επηρεάζει σημαντικά την ενδοκυττάρια επαγωγή των κυτοκινών IL-1β και IL-6 και κατά συνέπεια τη φλεγμονώδη απόκριση αυτών των ασθενών. Περαιτέρω έρευνες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών είναι απαραίτητες για να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που μπορούν να υποστηρίξουν το ρόλο των TLR2 και TLR4 στην φλεγμονώδη απόκριση στη ΧΝΝ και ΔΝ και στην ταυτοποίηση νέων θεραπευτικών στόχων. Όσον αφορά τη μέθοδο της πολλαπλής χαρτογράφησης απέτυχε να δείξει σημαντικές διαφορές στη πλειονότητα των φλεγμονωδών παραγόντων που μελετήθηκαν. Ένας περιορισμός της μελέτης μας θα μπορούσε να θεωρηθεί ο σχετικός μικρός αριθμός του πληθυσμού της μελέτης μας, και ιδιαίτερα της ομάδας των ασθενών με ΔΝ. Ο πιθανός ρόλος της IL-6 στη πειραματική βλάβη της ΔΝ, καθώς και η συμβολή του IP-10 ως δείκτης εξέλιξης νεφρικής βλάβης στη ΔΝ πρέπει να ερευνηθούν περαιτέρω. Τέλος, τα μειωμένα επίπεδα IL-4 ορού στη ΧΝΝ αποτελούν ένα ενδιαφέρον εύρημα που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Πιθανά η ταυτόχρονη μέτρηση των επιπέδων των φλεγμονωδών παραγόντων σε ορό και ούρα μέσω της μεθόδου πολλαπλής χαρτογράφησης θα μπορούσε να δώσει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το αν οι κυκλοφορούντες ή οι απεκκρινόμενες φλεγμονώδεις πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες νεφρικής βλάβης στη ΧΝΝ και τη ΔΝ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ΧΝΝ συμβάλλοντας ουσιαστικά στην αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Επιπλέον, τα υπάρχοντα δεδομένα έχουν δείξει ότι η ουραιμία σχετίζεται με δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, που χαρακτηρίζεται από μεταβολές στη φυσική και ειδική ανοσία. Η ΔΝ είναι η κύρια αιτία του τελικού σταδίου νεφρικής ανεπάρκειας στις αναπτυγμένες χώρες και παρόλο που παραδοσιακά θεωρείται μια μη ανοσολογική ασθένεια, τα νέα στοιχεία δείχνουν ότι οι φλεγμονώδεις και ανοσολογικοί μηχανισμοί μπορούν να παίξουν ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση και την εξέλιξη της νόσου. Οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που κατέχουν ηγετικό ρόλο στην επαγωγή της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης έναντι των μικροβιακών παθογόνων. Συμμετέχουν επίσης σε μη μολυσματικές φλεγμονώδεις καταστάσεις, μέσω της ενεργοποίησης μορίων μη-μικροβιακής προέλευσης (πρωτεΐνες θερμικού σοκ, κλάσματα του εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας). Ειδικότερα, οι TLRs δεσμεύονται με ειδικά προσδέματα και μέσω της ενεργοποίησης της οδού του ενδοκυττάριου πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ), επάγουν την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών συμπεριλαμβανομένων των ιντερλευκινών IL-6 και IL-1β που οδηγούν σε συστημική φλεγμονή στον ξενιστή. Έντεκα TLRs έχουν αναγνωρισθεί σε ανθρώπους και τα περισσότερα από αυτά έχουν εμπλακεί στην παθογένεση νεφρικών νόσων.

Τα υπάρχοντα στοιχεία δείχνουν ότι TLR2 και TLR4, εμπλέκονται στην παθογένεια της ΧΝΝ σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση και σε ασθενείς προτελικού σταδίου. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 και 2 έχουν αυξημένη έκφραση των μονοκυττάρων του TLR2 και TLR4, ενώ μια πρόσφατη μελέτη, έδειξε αύξηση της TLR4 έκφρασης *in vitro* στα νεφρικά σωληνάρια των ανθρώπινων νεφρών με ΔΝ. Ωστόσο, η συμβολή των TLRs στη φλεγμονώδη διαδικασία ασθενών με ΧΝΝ και ΔΝ δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε τη σημασία και την εκτίμηση της πιθανής συμβολής των TLRs στη συστημική φλεγμονή της ΧΝΝ και της ΔΝ, ερευνήσαμε τη μεμβρανική έκφραση των TLR2 και TLR4 στα μονοκύτταρα πριν και μετά την επαγωγή με το συνδέτη του TLR2, το συνθετικό λιποπεπτίδιο Pam3CSK4, σε μη αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς με ΧΝΝ με και χωρίς ΔΝ και σε ομάδα ελέγχου. Επίσης, σε υποομάδα ασθενών και από τις τρεις εξεταζόμενες ομάδες, μετρήσαμε την ενδοκυτταρική επαγωγή των κυτοκινών, IL-1β και IL-6 μετά τη διέγερση με το λιποπεπτίδιο Pam3CSK4. Επιπλέον, προκειμένου να περιγράψουμε καλύτερα τη φλεγμονή και να κατανοήσουμε την πολυπλοκότητα της έκφρασης των διαφόρων φλεγμονωδών παραγόντων στη ΧΝΝ και τη ΔΝ μετρήσαμε ταυτόχρονα στην ίδια ομάδα πληθυσμού της μελέτης, 27 φλεγμονώδεις πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου των κυτοκινών, χυμοκινών και των αυξητικών παραγόντων.

Ασθενείς και μέθοδοι: 85 μη αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς με ΧΝΝ [eGFR (MDRD): 34 (17–90) ml/min/1.73 m²] διαιρέθηκαν σε 2 ομάδες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι ΣΔ: 55 ασθενείς με ΧΝΝ μη διαβητικούς (ομάδα 1) και 30 ασθενείς με ΔΝ (ομάδα 2).

Και οι δυο ομάδες συγκρίθηκαν με 36 υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου). Και στις τρεις ομάδες των ασθενών προσδιορίστηκαν: α) η έκφραση των διαμεμβρανικών υποδοχέων TLR2 και TLR4 σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος, ενώ σε υποομάδα του πληθυσμού έγινε επιπλέον προσδιορισμός και σε διεγερμένα μονοκύτταρα με τον συνδέτη του TLR2, το συνθετικό λιποπεπτίδιο Pam3CSK4 μέσω κυτταρομετρίας ροής β) η ενδοκυττάρια έκφραση των ιντερλευκινών IL-1β και IL-6 μετά από επαγωγή με το λιποπεπτίδιο Pam3CSK4 μέσω κυτταρομετρίας ροής σε υποομάδα του πληθυσμού και γ) στο σύνολο του εξεταζόμενου πληθυσμού έγινε μέτρηση των επιπέδων 27 φλεγμονωδών παραγόντων (15 κυτοκίνες, 7 χυμοκίνες και 5 αυξητικούς παράγοντες) στον ορό μέσω της μεθόδου πολλαπλής χαρτογράφησης όπου είναι εφικτός ο ταυτόχρονος προσδιορισμός ενός μεγάλου αριθμού αναλυτέων ουσιών.

Αποτελέσματα: Η μεμβρανική έκφραση του TLR2 σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα ήταν στατιστικά αυξημένη και στις δύο ομάδες ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$). Μετά τη διέγερση με τον Pam3CSK4 παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της μεμβρανικής έκφρασης του TLR2 και στις τρεις ομάδες ($p < 0.01$). Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του TLR2 ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών. Η μεμβρανική έκφραση του TLR4 σε μη διεγερμένα μονοκύτταρα ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς της ομάδας 2 σε σχέση με τους ασθενείς της ομάδας 1 και την ομάδα ελέγχου ($p < 0.02$). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του TLR4 ανάμεσα στην ομάδα 1 και την ομάδα ελέγχου. Η διέγερση των μονοκυττάρων με τον Pam3CSK4 αύξησε στατιστικά σημαντικά την μεμβρανική έκφραση του TLR4 και στις τρεις εξεταζόμενες ομάδες, με την ομάδα 2 να επιδεικνύει μεγαλύτερη έκφραση σε σχέση με την ομάδα 1 και την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$). Η ομάδα 2 εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στους TLR2 και TLR4 υποδοχείς στα μη διεγερμένα μονοκύτταρα με την γλυκόζη ορού ($r = 0.426$, $p < 0.05$ και $r = 0.415$, $p < 0.05$ αντίστοιχα) και την HbA1c ($r = 0.581$, $p < 0.01$ και $r = 0.652$, $p < 0.01$ αντίστοιχα). Επίσης, η ομάδα 2 επέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον TLR4 και το λόγο πρωτεΐνης προς κρεατινίνη ούρων (uPCR) ($r = 0.385$, $p < 0.05$), ενώ δεν παρατηρήθηκε ανάλογη συσχέτιση για τον TLR2. Τέλος, η ομάδα 2 επέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της hsCRP και των δύο TLR υποδοχέων, TLR2 ($r = 0.434$, $p < 0.05$) και TLR4 ($r = 0.544$, $p < 0.01$). Αντιθέτως, στην ομάδα 1 η hsCRP συσχετίστηκε μόνο με τον TLR2 υποδοχέα ($r = 0.557$, $p < 0.01$) και όχι με τον TLR4 υποδοχέα. Η σταδιακή πολλαπλή παλινδρόμηση έδειξε ότι ο TLR2 και ο uPCR ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες της hsCRP στην ομάδα 1 ενώ στην ομάδα 2 ο TLR2 και ο TLR4 ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες της hsCRP.

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα των IL-1β και IL-6 στα μη διεγερμένα μονοκύτταρα ήταν χαμηλότερα στην ομάδα 1 σε σχέση με την ομάδα 2 και την ομάδα ελέγχου ($p < 0.01$), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα 2 και την ομάδα ελέγχου. Μετά την ενεργοποίηση με τον συνδέτη Pam3CSK4, τα επίπεδα και των δύο κυτοκινών αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις τρεις ομάδες ($p < 0.001$). Ωστόσο, ήταν χαμηλότερα στην ομάδα 1 σε σχέση με την ομάδα 2 και την

ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$), ενώ η ομάδα 2 εμφάνισε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$).

Όσον αφορά τη μέτρηση των φλεγμονωδών παραγόντων με τη μέθοδο της πολλαπλής χαρτογράφησης, τα επίπεδα των IL-6 and IP-10 ήταν αυξημένα στην ομάδα 1 και στην ομάδα 2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$). Οι IL-4, MCP-1 ήταν μειωμένες και στις δύο ομάδες των ασθενών σε σχέση με τους υγιείς ($p < 0.05$). Τα επίπεδα της IL-17 ήταν μειωμένα στην ομάδα 2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.001$) και με την ομάδα με την ομάδα 1 ($p < 0.05$). Ο G-CSF ήταν μειωμένος στην ομάδα 1 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.001$), ενώ ο PDGF ήταν μειωμένος στην ομάδα 2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$). Στους υπόλοιπους φλεγμονώδους παράγοντες δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις εξεταζόμενες ομάδες. Η χυμοκίνη IP-10 συσχετίστηκε αρνητικά με eGFR (MDRD) στους ασθενείς της ομάδας 2. Η ιντερλευκίνη IL-6 συσχετίστηκε θετικά με την απέκκριση πρωτεΐνης, όπως αυτή εκφράστηκε ως λόγος πρωτεΐνη/κρεατίνη (uPCR) στην ομάδα 2.

Συμπεράσματα: Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, προτείνεται ότι οι TLR2 και TLR4 εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο στα μονοκύτταρα ασθενών με ΧΝΝ και ΔΝ, φαινόμενο το οποίο επηρεάζεται από την παρουσία του διαβήτη και επηρεάζει σημαντικά την ενδοκυττάρια επαγωγή των κυτοκινών IL-1 β και IL-6 και κατά συνέπεια τη φλεγμονώδη απόκριση αυτών των ασθενών. Περαιτέρω έρευνες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών είναι απαραίτητες για να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που μπορούν να υποστηρίξουν το ρόλο των TLR2 και TLR4 στην φλεγμονώδη απόκριση στη ΧΝΝ και ΔΝ και στην ταυτοποίηση νέων θεραπευτικών στόχων. Όσον αφορά τη μέθοδο της πολλαπλής χαρτογράφησης απέτυχε να δείξει σημαντικές διαφορές στη πλειονότητα των φλεγμονωδών παραγόντων που μελετήθηκαν. Ένας περιορισμός της μελέτης μας θα μπορούσε να θεωρηθεί ο σχετικός μικρός αριθμός του πληθυσμού της μελέτης μας, και ιδιαίτερα της ομάδας των ασθενών με ΔΝ. Ο πιθανός ρόλος της IL-6 στη σπειραματική βλάβη της ΔΝ, καθώς και η συμβολή του IP-10 ως δείκτης εξέλιξης της νεφρικής βλάβης στη ΔΝ πρέπει να ερευνηθούν περαιτέρω. Τέλος, τα μειωμένα επίπεδα IL-4 ορού στη ΧΝΝ αποτελούν ένα ενδιαφέρον εύρημα που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Πιθανά η ταυτόχρονη μέτρηση των επιπέδων των φλεγμονωδών παραγόντων σε ορό και ούρα μέσω της μεθόδου πολλαπλής χαρτογράφησης θα μπορούσε να δώσει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το αν οι κυκλοφορούντες ή οι απεκκρινόμενες φλεγμονώδεις πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες νεφρικής βλάβης στη ΧΝΝ και τη ΔΝ.

SUMMARY

Toll-like Receptors and Chronic Kidney Disease

Zikou Xanthi

Inflammation plays an important role in the pathogenesis of Chronic Kidney Disease (CKD) contributing substantially to the increased morbidity and mortality. Furthermore, existing data have demonstrated that uremia is associated with dysfunction of the immune system, characterized by alterations in the innate and adaptive immunity. Diabetic Nephropathy (DN) is the leading cause of end stage renal disease (ESRD) in developed countries and although is traditionally considered a non-immune disease, new evidence indicates that inflammatory and immunological mechanisms may play an important role in its pathogenesis and progression. Toll-like receptors (TLRs) are transmembrane proteins holding a leading role in the induction of the innate immunologic responses against microbial pathogens. They are also involved in non-infectious inflammatory conditions, through agonists' activation of non-microbial origin (heat shock proteins, fractions of extracellular matrix). Specifically, TLRs bind with specific ligands and through activation of the intracellular nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway, induce the production of pro-inflammatory cytokines including interleukins IL-6 and IL-1 β leading to systemic inflammation to the host. Eleven TLRs have been recognized in humans and most of them have been implicated in the pathogenesis of renal diseases.

Existing evidence shows that TLR2 and TLR4, are involved in the pathogenesis of CKD-related complications in hemodialysis patients and predialysis CKD patients, though not in all studies. Furthermore, patients with diabetes mellitus type 1 and 2 have shown increased monocyte expression of TLR2 and TLR4, while a recent study, have demonstrated in vitro upregulation of TLR4 expression in the renal tubules of human kidneys with DN. However, the contribution of TLRs in the inflammatory process of predialysis CKD and DN is yet to be elucidated. In an effort to understand the importance and assess the possible contribution of TLRs in the systemic inflammation in CKD and DN, we investigated the membrane expression of TLR2 and TLR4 on monocytes before and after induction with the TLR2 ligand, the synthetic lipopeptide Pam3CSK4, in non-dialysis CKD patients with and without diabetes mellitus and in control group. In addition we assessed the intracellular production of the cytokines IL-1 β and IL-6 after induction with lipopeptide Pam3CSK4 in a subgroup of patients from the three studied groups. Furthermore, in order to delineate better inflammation and understand the expression complexity of the different inflammatory marker in CKD and DN, we have measured simultaneously 27 inflammatory molecules, including cytokines, chemokines and growth factors in the same population study.

Methods: 85 non-dialysis CKD patients with median estimated glomerular filtration rate (eGFR-MDRD) 34 (17-90) ml/min/1.73m² were divided in two groups, depending on having or not diabetes mellitus: 55 non diabetic CKD patients (group 1) and 30 patients with DN (group 2). Both groups were compared with 36 healthy

subjects (control group). In all three groups of patients we measured: a) the expression of transmembrane receptors TLR2 and TLR4 on unstimulated peripheral blood monocytes, while in subgroup of study population we have also assessed the expression on monocytes stimulated with the ligand of TLR2, the synthetic lipopeptide, Pam3CSK4, though flow cytometry b) the expression of intracellular interleukins IL-1 β and IL-6 after induction with the lipopeptide Pam3CSK4 through flow cytometry in subgroup of study population, and c) in the entire population we measured the levels of 27 inflammatory proteins (15 cytokines, 7 chemokines and 5 growth factors) using the method of Multiplexed analysis which is a process that allows the simultaneous determination of a large number of analyses.

Results: The membrane expression of TLR2 in resting monocytes was significantly higher in both patients' groups compared with controls ($p < 0.05$). A significant increase in TLR2 membrane expression in all studied groups was observed after cell stimulation with Pam3CSK4 ($p < 0.01$). The membrane expression of TLR4, in resting monocytes was significantly higher in group 2 compared with the two other study groups ($p < 0.02$), whereas no difference was observed between group 1 and controls. Cell stimulation with Pam3CSK4 significantly increased TLR4 membrane expression in all studied groups, with group 2 exhibiting higher TLR4 expression compared with either group 1 or control group ($p < 0.05$). Group 2 exhibited a significant correlation between TLR2 and TLR4 expression in resting monocytes with serum glucose ($r = 0.426$, $p < 0.05$ και $r = 0.415$, $p < 0.05$ respectively) and HbA1c levels ($r = 0.581$, $p < 0.01$ και $r = 0.652$, $p < 0.01$ respectively). In addition, group 2 exhibited a significant correlation between TLR4 and uPCR ($r = 0.385$, $p < 0.05$), while no correlation was found between TLR2 and uPCR. Finally, group 2 exhibited a significant correlation between hsCRP and both TLR2 ($r = 0.434$, $p < 0.05$) and TLR4 ($r = 0.544$, $p < 0.01$), while in group 1 hsCRP was significantly correlated with TLR2 ($r = 0.557$, $p < 0.01$) but not with TLR4. The stepwise multiple regression analysis demonstrated that TLR2 and uPCR were independent determinants of hsCRP in group 1. In group 2 both TLR2 and TLR4 were independent determinants of hsCRP.

The intracellular levels of IL-1 β and IL-6 in resting monocytes were lower in group 1 compared either with group 2 or with control group whereas no difference was observed between group 2 and controls ($p < 0.01$). Following activation with Pam3CSK4 the intracellular levels of both interleukins were significantly increased in all studied groups ($p < 0.001$), being lower in group 1 compared with controls or group 2 ($p < 0.05$), which exhibited higher levels compared with controls ($p < 0.05$).

Regarding the measurement of inflammatory proteins, IL-6 and IP-10 levels were significantly increased in group 1 and group 2 compared with control group ($p < 0.05$). IL-4 and MCP-1 were significantly reduced in both groups of patients compared with healthy controls ($p < 0.05$). IL-17 levels were significantly lower in group 2 compared with control group ($p < 0.001$) and group 1 ($p < 0.05$). Levels of G-CSF were significantly lower in group 1 in comparison with control group ($p < 0.001$) and PDGF levels were

significantly lower in group 2 compared with control group ($p < 0.05$). No statistically significant differences were observed with regards to the resting inflammatory proteins. IP-10 was negatively correlated with eGFR (MDRD) in group 2 and IL-6 was correlated with uPCR in the group 2.

Conclusions: According to the results of our study, we observed that TLR2 and TLR4 are expressed differently in monocytes of patients with CKD and DN, a phenomenon that is affected by the presence of diabetes and significantly affects the intracellular induction of the cytokines IL-1b and IL-6 and therefore the inflammatory response in these patients. Further studies with larger numbers of patients are needed in order understand the mechanisms that can support the role of TLR2 and TLR4 in the inflammatory response in CKD and DN and the identification of new therapeutic targets. Regarding the process of Multiplexed analysis, failed to show significant differences in the majority of inflammatory agents studied. One limitation of our study could be considered the relative small number of the population of our study, particularly the group of patients with DN. The potential role of IL-6 in glomerular damage of DN, and the contribution of IP-10 as renal progression index in DN should be further investigated. Finally, the reduced IL-4 serum levels in CKD, consists an interesting finding that requires further investigation. Probably the simultaneous measurement of the levels of inflammatory proteins in serum and urine through multiplex bead analysis method could provide more information about whether circulating or excreted inflammatory proteins can be used as markers in CKD and DN.

Βιβλιογραφία

1. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:S1.
2. Levey AS, Coresh J, Balk E, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003;139(7):605.
3. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005;67:2089.
4. Levey AS, Stevens LA, Coresh J. Conceptual model of CKD: applications and implications. *Am J Kidney Dis* 2009;53:4.
5. United States Renal Data System, USRDS 2010 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2010.
6. United States Renal Data System. USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. National Institutes of Health. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Bethesda, MD, 2013.
7. McClellan WM, Knight DF, Karp H et al. Early detection and treatment of renal disease in hospitalized diabetic and hypertensive patients: important differences between practice and published guidelines. *Am J Kidney Dis* 1997;29:368-75.
8. Nissenson AR, Collins AJ, Hurley J, et al. Opportunities for improving the care of patients with chronic renal insufficiency: current practice patterns. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1713-20.
9. Obrador GT, Pereira BJ, Kausz AT. Chronic kidney disease in the United States: an underrecognized problem. *Semin Nephrol* 2002;22:441-8.
10. Rettig RA, Norris K, Nissenson AR. Chronic kidney disease in the United States: a public policy imperative. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:1902-10.
11. KDIGO. Chapter 1: Definition and classification of CKD. *Kidney Int Suppl* 2013;3:19. http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf (Accessed on March 04, 2013).
12. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, et al. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 1981;241:85-93.
13. Wesson L. *Physiology of the human kidney*, Grune & Stratton, New York 1969;96-108.
14. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 2011;80:17-28.
15. Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with mortality and end-stage

- renal disease. A collaborative meta-analysis of kidney disease population cohorts. *Kidney Int* 2011;79:1331-40.
16. van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;79:1341-52.
 17. Gansevoort RT, Matsushita K, van der Velde M, et al. Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;80:93-104.
 18. Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Matsushita K, van der Velde M, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010;375:2073-81.
 19. Stevens LA, Coresh J, Greene T, et al. Assessing kidney function-measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med* 2006;354:2473-83.
 20. Miller WG. Estimating glomerular filtration rate. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47:1017-9.
 21. Jain AK, McLeod I, Huo C, et al. When laboratories report estimated glomerular filtration rates in addition to serum creatinins, nephrology consults increase. *Kidney Int* 2009;76:318-23.
 22. Hemmelgarn BR, Zhang J, Manns BJ, et al. Nephrology visits and health care resource use before and after reporting estimated glomerular filtration rate. *JAMA* 2010;303:1151-8.
 23. Stevens LA, Coresh J, Feldman HI, et al. Evaluation of the modification of diet in renal disease study equation in a large diverse population. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2749-57.
 24. Lin J, Knight ER, Hogan MI, et al. A comparison of prediction equations for estimating GFR in adults without kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2573-2780
 25. Froissart M, Rossert J, Jaquart C, et al. Predictive performance of the MDRD and Cockcroft-Gault estimations for estimating renal function. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:763-773
 26. Garg AX, Papaioannou A, Ferko N, et al. Estimating the prevalence of renal insufficiency in seniors requiring long-term care. *Kidney Int* 2004;65:649-653
 27. Rigalleau V, Lasseur C, Perlemoine C et al. Estimation of glomerular filtration rate in diabetic subjects: Cockcroft formula or modification of Diet in Renal Disease study equation? *Diabetes Care* 2005;28:838-843
 28. Earley A, Miskulin D, Lamb EJ, et al. Estimating equations for glomerular filtration rate in the era of creatinine standardization: a systematic review. *Ann Intern Med* 2012;156:785-95.
 29. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.

30. Stevens LA, Schmid CH, Greene T, et al. Comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73 m². *Am J Kidney Dis* 2010;56:486-95.
31. Quest Diagnostics. eGFR equation update. 2011 [updated 2011; cited 2011 September 25]; Available from file: [http://www.wpa kidney support.org/documents/ Quest%20 Estimated % 20 Glomerular % 20 Filtration % 20 Rate. pdf](http://www.wpa kidney support.org/documents/Quest%20Estimated%20Glomerular%20Filtration%20Rate.pdf).
32. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006; 116:288-96.
33. Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, et al. Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK). *Am J Kidney Dis* 2003;42:617-22.
34. Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, et al. Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clin Chem* 2009;55:24-38.
35. Coresh J, Byrd-Holt D, Astor BC, et al. Chronic kidney disease awareness, prevalence, and trends among U.S. adults, 1999 to 2000. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:180-8.
36. Coresh J, Astor BC, Greene T, et al. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 2003;41:1-12.
37. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of chronic kidney disease and associated risk factors--United States, 1999-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007;56:161-5.
38. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 2007;298:2038-47.
39. Chadban SJ, Briganti EM, Kerr PG, et al. Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:131-8.
40. Magnason RL, Indridason OS, Sigvaldason H, et al. Prevalence and progression of CRF in Iceland: a population-based study. *Am J Kidney Dis* 2002;40:955-63.
41. Jafar TH, Schmid CH, Levey AS. Serum creatinine as marker of kidney function in South Asians: a study of reduced GFR in adults in Pakistan. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1413-9.
42. Amato D, Alvarez-Aguilar C, Castañeda-Limones R, et al. Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. *Kidney Int Suppl* 2005;97:11-7.
43. Chen J, Wildman RP, Gu D, et al. Prevalence of decreased kidney function in Chinese adults aged 35 to 74 years. *Kidney Int* 2005;68:2837-45.
44. Hsu CC, Hwang SJ, Wen CP, et al. High prevalence and low awareness of CKD in Taiwan: a study on the relationship between serum creatinine and awareness from a nationally representative survey. *Am J Kidney Dis* 2006;48:727-38.

45. Hallan SI, Coresh J, Astor BC, et al. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2275-84.
46. United States Renal Data System 2009 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2009.
47. Peralta CA, Shlipak MG, Fan D, et al. Risks for end-stage renal disease, cardiovascular events, and death in Hispanic versus non-Hispanic white adults with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2892-9.
48. Feehally J. Ethnicity and renal disease. *Kidney Int* 2005;68:414-24.
49. Turin TC, Tonelli M, Manns BJ, et al. Lifetime risk of ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1569-78.
50. de Boer IH, Rue TC, Cleary PA, 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. *Arch Intern Med* 2011;171:412-20.
51. Perkins BA, Ficociello LH, Roshan B, et al. In patients with type 1 diabetes and new-onset microalbuminuria the development of advanced chronic kidney disease may not require progression to proteinuria. *Kidney Int* 2010;77:57-64.
52. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. Low glomerular filtration rate in normoalbuminuric type 1 diabetic patients: an indicator of more advanced glomerular lesions. *Diabetes* 2003;52:1036-40.
53. MacIsaac RJ, Panagiotopoulos S, McNeil KJ, et al. Is nonalbuminuric renal insufficiency in type 2 diabetes related to an increase in intrarenal vascular disease? *Diabetes Care* 2006;29:1560-6.
54. Kimmelstiel P, Wilson C. Benign and malignant hypertension and nephrosclerosis. A clinical and pathological study. *Am J Pathol* 1936;12:45-48.
55. Remuzzi G, Scieppati A, Ruggenti P. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2002;346: 1145-1151.
56. Orchard TJ, Dorman JS, Maser RE, et al. Prevalence of complications in IDDM by sex and duration. Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study II. *Diabetes* 1990;39:1116-24.
57. Parving HH, Hommel E, Mathiesen E, et al. Prevalence of microalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and neuropathy in patients with insulin dependent diabetes. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988;296:156-60.
58. Ismail N, Becker B, Strzelczyk P, et al. Renal disease and hypertension in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1999;55:1-28.
59. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Research Group, Nathan DM, Zinman B, et al. Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2005). *Arch Intern Med* 2009; 169:1307-16.

60. Krolewski AS, Warram JH, Christlieb AR, et al. The changing natural history of nephropathy in type I diabetes. *Am J Med* 1985;78:785-94.
61. Krolewski M, Eggers PW, Warram JH. Magnitude of end-stage renal disease in IDDM: a 35 year follow-up study. *Kidney Int* 1996;50:2041-6.
62. Bojestig M, Arnqvist HJ, Hermansson G, et al. Declining incidence of nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; 330:15-8.
63. Cowie CC, Port FK, Wolfe RA, et al. Disparities in incidence of diabetic end-stage renal disease according to race and type of diabetes. *N Engl J Med* 1989; 321:1074-9.
64. Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999;341:1127-33.
65. de Boer IH, Rue TC, Hall YN, et al. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2011;305(24): 2532-9.
66. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, et al. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 2003;63:225.
67. Nelson RG, Knowler WC, Pettitt DJ, et al. Diabetic kidney disease in Pima Indians. *Diabetes Care* 1993;16:335.
68. Steinke JM, Sinaiko AR, Kramer MS et al. The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: III. Predictors of 5-year urinary albumin excretion rate patterns in initially normoalbuminuric patients. *Diabetes* 2005; 54: 2164-2171.
69. Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF- β as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 2004;15 (Suppl 1): S55–S57.
70. Ichinose K, Kawasi E, Eguschi K. Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2007;27:554–564.
71. Raptis AE and Viberti G. Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109 (Suppl 2): S424–S437.
72. Singh DK, Winocour P, Farrington K. Mechanisms of disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008;4:216.
73. Ziyadeh FN and Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev* 2008;4:39–45.
74. Wolf G and Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1999;56:393-405.
75. Wolf G and Ziyadeh FN. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 2007;106:26-31.
76. Hilgers KF and Veelken R. Type 2 diabetic nephropathy: never too early to treat? *J Am Soc Nephrol* 2005;16:574-575.
77. Chen ZJ, Yang YB, Huang SM. Expression of VEGF in kidney of diabetic rats [Chinese]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007;38:633–636.

78. Mauer SM, Steffes MW, Connett J et al. The development of lesions in the glomerular basement membrane and mesangium after transplantation of normal kidneys to diabetic patients. *Diabetes* 1983;32:948–952.
79. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1991;325:836–842.
80. Cooper ME. Pathogenesis prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet* 1998;352:213–219
81. Yamagishi S, Fukami S, Ueda S et al. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr Drug Targets* 2007;8: 952–959.
82. Daneman D, Crompton CH, Balf JW et al. Plasma prorenin as an early marker of nephropathy in diabetic (IDDM) adolescents. *Kidney Int* 1994;46: 1154–1159.
83. Nguyen G. Renin/prorenin receptors. *Kidney Int* 2006;69:1503–1506.
84. Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T et al. Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1950–1961.
85. Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K et al. Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77 (Suppl 1): S41–S45.
86. Vasavada N and Agarwal R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis* 2005;12:146–154.
87. Suzuki D, Miyata T, Saotome N et al. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:822–832.
88. Benigni A, Gagliardini E, Tomasoni S et al. Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2004;65:2193–2200.
89. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005;54:1626–1634.
90. Adler S. Diabetic nephropathy: Linking histology, cell biology, and genetics. *Kidney Int* 2004;66:2095.
91. Trevisan R, Viberti G. Genetic factors in the development of diabetic nephropathy. *J Lab Clin Med* 1995;126: 342-9.
92. Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, et al. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990;33(7):438-43.
93. Satko SG, Langefeld CD, Daeihagh P, et al. Nephropathy in siblings of African Americans with overt type 2 diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2002;40 (3):489-94.

94. Vardarli I, Baier LG, Hanson LR, et al. Gene for susceptibility to diabetic nephropathy in type 2 diabetes maps to 18q 223-23. *Kidney Int* 2002;62(6): 2176-2183.
95. Iyengar SK, Abboud HE, Goddard KA et al. Genome-wide scans for diabetic nephropathy and albuminuria in multiethnic populations: the family investigation of nephropathy and diabetes (FIND). *Diabetes* 2007;56(6): 1577-1585.
96. Jeffers BW, Estacio RO, Raynolds MV et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus and its relationship with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1997;52(2):473-7.
97. Yoshida H, Kuriyama S, Atsumi Y, et al. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1996; 50(2):657-64.
98. Kuramoto N, Iizuka T, Ito H, et al. Effect of ACE gene on diabetic nephropathy in NIDDM patients with insulin resistance. *Am J Kidney Dis* 1999;33(2): 276-81.
99. Boright AP, Paterson AD, Mirea L, et al. Genetic variation at the ACE gene is associated with persistent microalbuminuria and severe nephropathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC Genetics Study. *Diabetes* 2005;54(4):1238-44.
100. Hadjadj S, Tarnow L, Forsblom C, et al. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and diabetic nephropathy: case-control, haplotype, and family-based study in three European populations. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(4):1284-91.
101. Ma RC, Tam CH, Wang Y, et al. Genetic variants of the protein kinase C-beta 1 gene and development of end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2010;304(8):881-9.
102. Stenvikel P. Inflammation in end-stage renal disease: A fire that burns within. *Contrib Nephrol* 2005;149:185-99.
103. Kalantar-Zadeh K. Inflammatory Marker Mania in Chronic Kidney Disease: Pentraxins at the crossroad of universal soldiers of inflammation. *C JANS* 2007;2:872-875.
104. Ridker PM, Rifai N, Rose I et al. Comparison of CRP and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-1565.
105. de Lorgeril M, Salen P: Cholesterol lowering and mortality: Time for a new paradigm? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:387-390.
106. Zebrack JS, Anderson JL, Beddhu S, et al. Do associations with C-reactive protein and extent of coronary artery disease account for the increased cardiovascular risk of renal insufficiency? *J Am Coll Cardiol* 2003;42:57-63.
107. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, et al: Biomarkers of inflammation and progression of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:237-245.
108. Stenvikel P. Inflammation as a target for improving health in chronic kidney disease. *Med Reports* 2010;2:88.

109. Silvestrein DM. Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1445-1452.
110. Luis M Ortega, Alessia Fornoni. Role of cytokines in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease, glomerulonephritis, and end-stage kidney disease. *International Journal of Interferon, Cytokines and Mediator Research* 2010;2:49-62.
111. Schindler R, Krautzing S, Lufft V et al. Induction of interleuchin-1 and interleuchin-1 receptor antagonist during contaminated in vitro dialysis with white whole blood. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:101-108.
112. Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT et al. Balance between IL-1 β , TNF- α and their specific inhibitor in chronic renal failure and maintainace dialysis. *J Immunol* 1995;154:882-892.
113. Carrero JJ, Yilmaz MI, Lindholm B et al. Cytokine dysregulation in chronic kidney disease: how can we treat it? *Blood Purification* 2008;26:291-299.
114. Pertosa G, Grandallo G, Gesualdo L et al. Clinical relevance of cytokine production in hemodialysis. *Kidney Int* 2000;58:104-111.
115. Takahashi S, Kapas L, Fang J et al. Somnogenic relationships between tumor necrosis factor and interleuchin -1. *Am J Physiol* 1999;276:1132-1140.
116. Kaizu Y, Kimura M, Yoneyama T et al. Interleuchin-6 may mediate malnutrition in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1998;31: 93-100.
117. Hasuike Y, Nonogushi H, Ito K et al. Interleuchin-6 is a predictor of mortality in stable hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2009;30(4):389-398.
118. Tipping PG and Stephen R. Holdsworth. Cytokines in Glomerulonephritis. *Semin Nephrol* 2007;27:275-285.
119. Kurts C, Heymann F, Lukacs-Koornek V et al. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. *Semin Immunopathol* 2007;29:317-335.
120. Van Den Berg JG, Aten J, Chand MA et al. Interleuchin-4 and Interleuchin-13 act on glomerular visceral epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(3): 314-422.
121. Bantis C, Heerinh PJ, Luther Y et al. Infleunce of cytokine gene polymorphism in focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Nephrol.* 1999;10:1466-1477
122. Yano N, Endoh M, Nomoto Y et al. Phenotypic characterization of cytokine expression in patients with IgA nephropathy. *J Clin Immunol.* 1997;17(5): 396-403.
123. Tesar V, Masek Z, Rychlik I et al. Cytokines and adhesion molecules in renal vasculitis and lupus nephritis. *Nephrol Dial Trasplant* 1998;13(7):1662-1667.
124. Mora C and Navarro JF. Inflammation and diabetic nephropathy. *Current Diabetes Reports* 2006;6:463-468.
125. Navarro JF and Mora C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:433-442.
126. Galkina E, Ley K: Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:368-377.

127. Shikata K, Makino H: Role of macrophages in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol* 2001;1:46-54.
128. Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson DJ, et al. Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: Correlation with diabetic state and progressive renal injury. *Kidney Int* 2004;65:116-128.
129. Ihm CG: Monocyte chemotactic peptide-1 in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1997;Suppl 60:S20-S22.
130. Chow F, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int* 2006;69:73-80.
131. Okada S, Shikata K, Matsuda M, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes. *Diabetes* 2003;52:2586-2593.
132. Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1711 -1722.
133. Cheng H, Wang C, Moeckel G, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int* 2002;62:929-939.
134. Levine DZ: Hyperfiltration, nitric oxide, and diabetic nephropathy. *Curr Hypertens Rep* 2006;8:153 -157.
135. Nakagawa T: Uncoupling of the VEGF-endothelial nitric oxide axis in diabetic nephropathy: an explanation for the paradoxical effects of VEGF in renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:1665 -1672.
136. Flyvbjerg A, Khatir DS, Jensen LJ, et al. The involvement of growth hormone (GH), insulin-like growth factors (IGFs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic kidney disease. *Curr Pharm Des* 2004;10: 3385- 3394.
137. Pantsulaia T. Role of TGF-beta in pathogenesis of diabetic nephropathy. *Georgian Med News* 2006;131:13 -18.
138. Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006;16 [Suppl 1]: S30-S33.
139. Mezzano S, Aros C, Droguet A, et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19: 2505- 2512.
140. Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y et al. European cDNA Bank (ERCB) Consortium: Modular activation of nuclear factor-kappaB transcriptional programs in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006;55: 2993- 3003
141. Hasegawa G, Nakano K, Sawada M, et al. Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1991;40: 1007- 1012.
142. Hasegawa G, Nakano K, Kondo M. Role of TNF and IL-1 in the development of diabetic nephropathy. *Nefrologia* 1995;15:1- 4.

143. Pfeilschifter J, Pignat W, Vosbeck K, et al. Interleukin 1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate prostaglandin synthesis and phospholipase A2 release from rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:385-394.
144. Royall JA, Berkow RL, Beckman JS, et al. Tumor necrosis factor and interleukin 1 increase vascular endothelial permeability. *Am J Physiol* 1989;257:339- 410.
145. Dalla Vestra M, Mussap M, Gallina P, et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2005;16 [Suppl 1]:S78- S82.
146. Hirano T, Akira S, Taga T, et al. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* 1990;11:443- 449.
147. Moriwaki Y, Yamamoto T, Shibutani Y, et al. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor- α in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. *Metabolism* 2003;52:605- 608.
148. Nakamura A, Shikata K, Hiramatsu M, et al. Serum interleukin-18 levels are associated with nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:2890- 2895.
149. Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, et al. mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 1993;42:450- 456.
150. Sugimoto H, Shikata K, Wada J, et al. Advanced glycation end products-cytokine-nitric oxide sequence pathway in the development of diabetic nephropathy: Aminoguanidine ameliorates the overexpression of tumour necrosis factor- α and inducible oxide synthase in diabetic rat glomeruli. *Diabetologia* 1999;42:878- 886.
151. Baud L, Perez J, Friedlander G et al. Tumor necrosis factor stimulates prostaglandin production and cyclic AMP levels in rat cultured mesangial cells. *FEBS Lett* 1989;238:50-54.
152. Bertani T, Abbate M, Zoja C, et al. Tumor necrosis factor induces glomerular damage in rabbit. *Am J Pathol* 1989;134:419- 430.
153. Navarro J, Milena F, Mora C, et al. Tumor necrosis factor- α gene expression in diabetic nephropathy: Relationship with urinary albumin excretion and effect of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Kidney Int Suppl* 2005;99:S98- S102.
154. Navarro JF, Mora C, Macía M, et al. Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin excretion in type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 2003;42:53- 61.
155. Navarro JF, Mora C, Rivero A, et al. Urinary protein excretion and serum tumor necrosis factor in diabetic patients with advanced renal failure: effects of pentoxifyline administration. *Am J Kidney Dis* 1999;33:458-463.
156. Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson DJ et al. Macrophage in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury. *Kidney Int* 2004; 65:116-128.
157. Chow F, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int* 2006;69:73- 80.

158. Tashiro K, Koyanagi I, Saitoh A et al. Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 and interleuchin-8 and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal* 2002;16:1-4.
159. Chiarelli F, Cipollone F, Mohn A et al. Circulating monocyte chemoattractant protein-1 and early development of nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1829-1834.
160. Takebayashi K, Matsumoto S, Aso Y et al. Association between circulating monocyte chemoattractant protein-1 and urinary albumin excretion in non obese type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2006;20: 98-104.
161. Bottinger EP, Bitzer M. TGF- β signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 2002;13: 2600-2610.
162. Koesters R, Kaissling B, Lehir M et al. Tubular overexpression of TGF- β induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *Am J Pathol* 2010;177: 632-643.
163. August P, Sathanrhiran M. TGF- β and progression of renal disease. *Kidney Int Suppl* 2003;87:99-104.
164. Li B, Khanna A, Sharma V et al. TGF- β 1 DNA polymorphisms, protein levels and blood pressure. *Hypertension* 1999;33:271-275.
165. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Fctor Rev* 2004;15:255-273.
166. Floegue J, Eitner F, Alpers CE. A new look at PDGF in renal disease *J Am Soc Nephrol* 2008;19:12-23.
167. Ostendorf T, Kunter U, Grone HJ et al. Specific antagonism of PDGF prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:909-918.
168. Ostendorf T, Rong S, Boor P et al. Antagonism of PDGF-D by human antibody CR002 prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1504-1562.
169. Boor P, Eitner F, Cohen CD et al. Patients with IgA nephropathy exhibit high systemic PDGF-DD levels. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2755-2762.
170. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: A final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:17-25.
171. Kang DH, Johnson RJ. Vascular endothelial growth factor: A new player in the pathogenesis of renal fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12:43-49.
172. Kang DH, Hughes J, Mazzali M et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model. VEGF administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1448-1457.
173. Kang DH, Kim YG, Andoh TF et al. Post-cyclosporine-mediated hypertension and nephropathy: amelioration by VEGF. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:727-736.
174. De Vriese AS, Tilton RG, Elger M et al. Antibodies against VEGF improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:993-1000.

175. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, Tilton RG et al. Pathophysiological role of VEGF in the remnant kidney. *Nephron Exp Nephrol.* 2005;101:9-15.
176. Schrijvers BF, Rasch R, Tilton RG et al. High protein-induced glomerular hypertrophy is VEGF- dependent. *Kidney Int* 200;61:1600-4.
177. Flyvbjerg A, Dagnanaes-Hansen F, De Vriese AS et al. Amelioration of long-term renal changes in obese type 2 diabetic mice by neutralizing VEGF antibody. *Diabetes* 2002; 51:3090-3094.
178. Boor P and Floege J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2011;38:441-450.
179. Tesch GH. Macrophage and diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2010;30(3):290-301.
180. Kawai T and Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on TLRs. *Nature Immunology* 2010;11:373-384.
181. Akira S and Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature Immunology* 2004;4:499-511.
182. C. Pasare and R. Medzhitov, Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin. Immunol.*, 2004;16:23-26.
183. Lemaitre B, N.E., Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86: 973- 83.
184. Akira S, Uematsu S, Tacheuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;14:781-801.
185. J.da Silva Correia, K.S. U. Christen, P.S. Tobias, et al. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex: transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J. Biol. Chem.*, 2001;276: 21129- 21135.
186. Hoebe K, G.P., Rutschmann S, Du X, Mudd S, et al: CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, 2005; 433:523- 527.
187. Barbalat R, Lau L, Locksley RM, et al. Toll-like receptor-2 on inflammatory monocytes induces type-1 interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol* 2009;10:1200-1207.
188. Matsumoto M and T. Seya. TLR3: Interferon induction by double- stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev.*, 2008.;60(7): 805-12.
189. Seya T, Shingai M, and M.M. Uirusu, Toll-like receptors that sense viral infection. 2004;54(1):1-8.
190. Hemmi H, T.O., Kawai T, Kaisho T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000;408:740- 745.
191. Anders JA. Toll-like Receptors and Danger Signaling in Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1270-1274.
192. Brikos C and O.N. LA., Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*, 2008;183:21-50.
193. Glubba A, Banach M, Simon H. The role of Toll-like receptors in renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2010;6:224-235.

194. Smith KD. Toll-like receptors in kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2009;18:1-8.
195. Svanborg C, Bergsten G, Fischer H, et al. Uropathogenic *Escherichia Coli* as a model of host-parasite interaction. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9:33-39.
196. Song J and Abraham S. TLR-mediated immune responses in the urinary tract. *Curr. Opin .Microbiol.* 2008;11:66-73.
197. Anderson-Nissen E, Hawn TR, Smith KD et al. Cutting edge: TLR5^{-/-} mice are more susceptible to *Escherichia Coli* urinary tract infection. *J Immunol* 2007;178:4717-4720.
198. Ragnarsdottir B, Samuelsson M, Gustafsson MC et al. Reduced TLR4 expression in children with asymptomatic bacteriuria. *J. Infect Dis* 2007;196:475-484.
199. Patole PS, Schubert S, Hildinger K et al. TLR4 renal cells and bone marrow cells signal for neutrophil recruitment during pyelonephritis. *Kidney Int* 2005;68:2582-2587.
200. Yang CW, Hung CC, Wu MS et al. TLR2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cell. *Kidney Int* 2006;69:815-822.
201. Viriyakosol S, Matthias M, Swancutt M et al. TLR4 protects against lethal *Leptospira Interrogans* infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. *Infect Immun.* 2006;74:887-895.
202. Groenveld A, Tran D, van der Meulen J et al. Acute renal failure in intensive care unit: predisposing, complicating factors and outcome. *Nephron* 1991;59:602-610.
203. Cunningham P, Wang Y, Guo R et al. Role of TLR4 in endotoxin –induced acute renal failure. *J Immunol* 2004;172:2629-2635.
204. Brown HL, Sacks SH, Robson MG. TLR2 agonists exacerbate accelerated nephrotoxic nephritis. *J Am Nephrol* 2006;17:1931-1939.
205. Papadimitraki ED, Tzardi M, Bertzias G et al. Glomerular expression of TLR9 in lupus nephritis but not in normal kidneys: implications for the amplification of the inflammatory response. *Lupus* 2008;18:831-835.
206. Christensen SR et al. TLR9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J Exp. Med.* 2005;202:321-331.
207. Pawar RD et al. Inhibition of TLR7 or TLR7 plus TLR9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1721-1723.
208. Fairhurst AM et al. Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7. *Eur J Immunol* 2008;38:1971-1978.
209. Pawar RD, Patole PS, Zecher D et al. TLR7 modulates immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:141-149.
210. Wornle M, Schmid H, Banas B et al. Novel role of TLR3 in hepatitis C-associated glomerulonephritis. *AJP* 2006;16:370-385.

211. Nogueira E, Ponciano VC, Naka EL et al. Toll-like receptors-related genes in kidney transplant patients with chronic allograft nephropathy and acute rejection. *Intern. Immunopharm.* 2009;9: 673-676.
212. Pratt JR, Basheer SA and Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat. Med.* 2002; 8:582-587.
213. Chen L, Ahmed E, Wang T et al. TLR signals promote IL-6/IL-17-dependent transplant rejection. *J. Immunol.* 2009;182: 6217-6225.
214. Palmer SM, Burch LA, Mir S et al. Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation. *Clin. Transplant.* 2006;20: 30-36.
215. Kwon J, Park J, Lee D et al. Toll-like receptor expression in patients with renal allograft dysfunction. *Transplant Proc* 2008;40(10):3479-3480.
216. Kruger B, Krick S, Dhillon N et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009;106: 3390- 3395.
217. de Groot K, Kuklik K, Brocker V et al. Toll-like receptor 2 and renal allograft function. *Am. J. Nephrol* 2008;28:583-588.
218. Agrawal M and Swartz R. Acute renal failure. *Am. Fam. Physician* 2000;61:2077-2088.
219. Preston RA and Epstein M. Ischemic renal disease: an emerging cause of chronic renal failure and end-stage renal disease. *J. Hypertens.* 1997;15:1365-1377.
220. Eleftheriadis T and Lawson BR. Toll-like receptors and kidney diseases. *Inflammation and Allergy- Drug Targets*, 2009;8:191-201.
221. Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN- and TNF-mediated up-regulation during inflammation. *J. Immunol* 2002;168:1286-1293
222. Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ et al. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J. Immunol* 2007;178:6252-6258.
223. Leemans JC, Stockman G, Claessen N et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J. Clin. Invest.* 2005;115:2894-2903.
224. Pulskens WP, Teske GJ, Butter LM et al. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury *PLoS ONE.* 2008;3: e3596.
225. Wu H, Chen G, Wyburn KR et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 2007;117:2847-2859.
226. Kato S, Chmielewski M, Honda H et al. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:1526-1533.
227. Gollapudi P, Yoon JW, Gollapudi S et al. Leucocyte Toll-like receptor expression in end-stage kidney disease. *Am J Nephrol* 2010;31:247-254.

228. Kuroki Y, Tsuchida K, Go I et al. A study of innate immunity in patients with end-stage renal disease: special reference to toll-like receptor-2 and -4 expression in peripheral blood monocytes of hemodialysis patients. *International Journal of Molecular Medicine* 2007;19:73-790.
229. Kato S, Yuzawa Y, Tsuboi N et al. Endotoxin- induced chemokine expression in murine peritoneal mesothelial cells: the role of toll-like receptor-4. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1289-1299.
230. Ando M, Shibuya A, Tsuchiya K et al. Reduced expression of Toll-like receptor-4 contributes to impaired cytokine response of monocytes in uremic patients. *Kidney Int* 2006;70:358-362.
231. Li F, Yang N, Zhanh L et al. Increased Expression of Toll-like Receptor 2 in Rat Diabetic Nephropathy. *Am J Nephrol.* 2010;32:179- 186.
232. Lin M, Yiu WH, Wu HJ et al. Toll-like receptor 4 Promotes Tubular Inflammation in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:86-102.
233. Mudaliar H, Polloc C, Komala MG et al. The role of Toll-like receptor -2 και -4 in mediating inflammation in proximal tubules. *Am J Renal Physiol* 2013;305:143-154.
234. Kamyar Kalantar-Zadeh. Inflammatory Marker Mania in Chronic Kidney Disease: Pentraxins at the Crossroad of Universal Soldiers of Inflammation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:872-875.
235. Rizt E. Diabetic Nephropathy. *Saudi J Kidney Dis Transl.* 2006;17(4): 481-90.
236. Tuttle KR: Linking metabolism and immunity: Diabetic Nephropathy is an inflammatory disease. *Am Soc Nephrol* 2005;16:1537-1538.
237. Koc M, Toprak A, Arikan H, et al. Toll-like receptor expression in monocytes in patients with chronic kidney disease and haemodialysis: relation with inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:955-963.
238. Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, et al. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:578-583.
239. Dasu MR, Devaraj S, Park S et al. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2010;33:861-868.
240. Moutzouri E, Tellis CC, Rousouli K, et al. Effect of simvastatin or its combination with ezetimibe on Toll-like receptor expression and lipopolysaccharide-induced cytokine production in monocytes of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 2012;225:381-387.
241. Methe H1, Kim JO, Kofler S, et al. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14+ monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jul;25(7):1439-45.
242. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic Kidney Disease: Effects on the Cardiovascular System. *Circulation.* 2007;116:85-97.

243. McIntyre CW, Harrison LE, Eldehni MT, et al. Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(1):133-141.
244. Kaur H, Chien A and Jialal I. Hyperglycemia induces Toll like receptor 4 expression and activity in mouse mesangial cells: relevance to diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;303:1145-1150.
245. Ghanim H, Mohanty P, Deopurkar R, et al. Acute modulation of toll-like receptors by insulin. *Diabetes Care* 2008;31:1827-1831.
246. Kim JJ and Sears DD. TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterol Res Pract* 2010;2010, pii 212563.
247. Naqvi SB and Collins AJ. Infectious complications in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2006;13:199-204.
248. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, et al. Expression of Toll-like receptor in Human Artherosclerotic Lesion: a possible pathway for activation. *Circulation*. 2002;105:1158-1161.
249. Lorenzen JM, David S, Richter A et al. TLR-4+ peripheral blood monocytes and cardiovascular events in patients with chronic kidney disease-a prospective follow-up study. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(4):1421-4.
250. Juan Jesus Carrero, Mahmut Liker Yilmaz, et al. Cytokines Dysregulation in Chronic Kidney Disease: How Can We Treat It? *Blood Purif* 2008; 26:291-299
251. Wong CK, Szeto CC, Chan MHM, et al. Elevation of proinflammatory cytokines, C-reactive protein and cardiac troponin T in chronic renal failure patients on dialysis. *Immunol Invets* 2007;36:47-57.
252. Daniela V Barreto, Felype C Barreto, Sophie Liabeuf, et al. Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney International* 2010;77: 550-556.
253. Sekizuya K, Tomino Y, Sei C, et al. Detection of serum IL-6 in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 1994;68:284-285.
254. Suzuki D, Miyazaki M, Naka R, et al. In situ hybridization of interleukine 6 in diabetic nephropathy. *Diabetes* 1995;44:1233-1238.
255. Navarro JF, Milena FJ, Mora C, et al. Renal pro-inflammatory cytokine gene expression in diabetic nephropathy: Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and pentoxifylline administration. *Am J Nephrol* 2006;26:562-570.
256. Rieko Okada, Kenji Wakai, Mariko Naito, et al. Pro-/anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms and chronic kidney disease: a cross-sectional study. *BCM Nephrology* 2012;13:2.
257. Mohammad Kazemi Arababadi, Reza Nosratabadi, Gholamhossein Hassanshahi et al. Nephropathic complication of type-2 diabetes is following pattern of autoimmune diseases? *Diabetes Research and Clinical Practice* 2010;87: 33-37.
258. Imig JD and Ryan MJ. Immune and Inflammatory Role in Renal Disease. *Compr Physiol*. 2013;3(2):957-976.

259. Matsumoto K and Kanmatsuse K. Increased Urinary Excretion of Interleukine - 17 in Nephrotic patients. *Nephron* 2002;91:243-249.
260. Jian Wu, Yaqing Ding, Chunling Zhu, et al. Urinary TNF- α and NGAL are correlated with the progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Exp Ther Med*. 2013; 6(6):1482-1488.
261. Xu H, Nakayama K, Ogawa S, et al. Elevated plasma concentration of IP-10 in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 2005;47(5): 524-30.
262. Liu J, Zhao Z, Willcox MD, et al. Multiplex Bead Analysis of urinary cytokines of type 2 Diabetic patients with normo- and microalbuminuria. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2010;31(4): 279-289.
263. Mansouri L, Paulsson JM, Moshfegh A, et al. Leukocyte proliferation and immune modulator production in patients with chronic kidney disease. *PLoS One*. 2013;8(8):e73141.
264. Ha H, Yu MR, Choi YJ, et al. Role of high glucose- induced nuclear factor-kappa B activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:894-902.
265. Banba N, Nakamura T, Matsumura M, et al. Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2000;58(2):684-90.
266. Van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J. The platelet-derived growth factor system in renal disease: an emerging role of endogenous inhibitors. *Eur J Cell Biol*. 2012;91(6-7):542-51.
267. Tang WW, Ulich TR, Lacey DL et al. Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J. Pathol* 1996;148:1169-80.
268. Wang QY, Guan QH, Chen FQ. The changes of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) in T2DM and its clinical significance for early diagnosis of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009;85(2):166-70.
269. Langham RG, Kelly DJ, Maguire J et al. Over-expression of platelet-derived growth factor in human diabetic nephropathy. *Nephro. Dial. Transplant* 2003;18(7):1392-6.