

**"ALMA MATER STUDIORUM A.D. 1088"
UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

**DOTTORATO IN SCIENZE MEDICHE SPECIALISTICHE
XXVI ciclo
Settore Concorsuale di afferenza 06/D2
Settore Scientifico disciplinare MED/14**

TESI DI DOTTORATO

**"LA FOTOCHEMIOTERAPIA EXTRACORPOREA (ECP) NEL
TRATTAMENTO DELLE GLOMERULONEFRITI"**

Dott. Marco Cavallini

Coordinatore Dottorato Prof. Sandro Mattioli

Relatore Prof. Gaetano La Manna

Correlatore Prof. Gaspare Elios Russo

ESAME FINALE ANNO 2014

INDICE

1 - INTRODUZIONE GENERALE	I
1.1 - LE GLOMERULONEFRITI	I
1.3 - ETIOPATOGENESI DEL DANNO NELLE GLOMERULONEFRITI.....	IV
1.3.1 - Immunità umorale	IV
1.3.2 - Immunità cellulare.....	VI
1.4 - MECCANISMI DI DANNO IMMUNITARIO AI GLOMERULI	VII
1.4.1 - Meccanismi non infiammatori di danno glomerulare	VII
1.4.2 - Meccanismi infiammatori di danno glomerulare	XVI
1.5 - TERAPIA.....	XIX
1.5.1 - Terapia delle sindrome nefritica	XX
1.5.2 - Terapia della sindrome nefrosica.....	XXI
1.5.3 - Terapia specifica delle GNF primitive	XXII
1.5.4 - Risultati ottenuti con terapia farmacologica	XXV
1.6 - MODERNE CONSIDERAZIONI SULL'ETIOPATOGENESI DELLE GNF ...	XXVII
2 - LA FOTOFERESI	XXIX
2.1 - CONCETTI GENERALI	XXX
2.2 - ASPETTI TECNICI	XXX
2.3 - MECCANISMO D'AZIONE	XXXI
2.4 - EFFETTI COLLATERALI	XXXVII
2.5 - INDICAZIONI CLINICHE.....	XXXVIII
3 - SCOPO DELLO STUDIO	XLI
4 - MATERIALI E METODI	LVI
5- CONCLUSIONI	LIX
6 - DISCUSSIONE	XLVI
7 - CONCLUSIONI	L
8 - BIBLIOGRAFIA	LIV

1 - INTRODUZIONE GENERALE

1.1 - LE GLOMERULONEFRITI

Le alterazioni della struttura e della funzione glomerulare, costituiscono uno dei problemi principali da risolvere nell'ambito della nefrologia pratica. Fin dai tempi di Bright lo studio delle glomerulopatie è stato focalizzato sulle relazioni esistenti fra gli aspetti clinici e le alterazioni anatomopatologiche.

L'introduzione e la vasta applicazione della biopsia renale percutanea hanno permesso l'esplorazione di questo aspetto delle glomerulopatie [2-3].

Le patologie, prima considerate omogenee, si sono così nel tempo sempre più suddivise e riclassificate portando alla luce nuove conoscenze sulle relazioni esistenti tra gli aspetti clinici, la patologia sottostante, la storia naturale e la risposta al trattamento.

Negli ultimi anni si è sempre più evidenziata l'importanza dell'immunopatologia che ha fornito prove evidenti del ruolo fondamentale svolto dai meccanismi immunopatologici in queste patologie [1-2]. Agenti ambientali (batteri, virus, farmaci) sono stati sempre più incriminati quali fattori eziologici di molte lesioni glomerulari.

Molti progressi sono stati anche fatti nella comprensione degli eventi biochimici e funzionali che hanno luogo nella parete glomerulare [4-5-6].

Le patologie glomerulari si devono quindi affrontare a diversi livelli simultaneamente: il primo, riguarda le *caratteristiche cliniche*; il secondo la *morfologia*; il terzo il *meccanismo patogenetico* responsabile; il quarto, infine, i fattori e gli *agenti eziologici* conosciuti chiamati in causa.

Le glomerulopatie costituiscono pertanto un insieme di patologie che vengono classificate in base all'etiologia, al quadro istopatologico ed alle caratteristiche cliniche. Si deduce, quindi, che per una stessa malattia possono coesistere diverse nomenclature. Deve comunque essere tenuto ben presente il fatto che il danno glomerulare nel 75% dei casi viene provocato da processi immunologici [1-7-8].

CAUSA DELLA NEFROPATIA	%	P
Glomerulonefriti	21,3%	P<0,001
Reni policistici	13,9%	
Pielonefrite cronica	20,9%	
Nefroangiosclerosi	14,3%	P<0,01
Diabete/mal. Sistem.	12,9%	P<0,01
Altre	16,4%	

Tabella 1: Cause di IRC nel biennio '89-'91(Giornale Italiano di Nefrologia/Vol.10 n.6, 1993)

	1997		1998	
	N.	%	N.	%
Diabete	100892	33,2	33096	41,8
Ipertensione	72961	24	20066	25,4
Glomerulonefriti	52229	17,2	7390	9,3
Malattia cistica	13992	4,6	1772	2,2

Prevalenza n°=304083

Incidenza n°= 79102

Tabella 2: Cause di IRC in uno studio Americano del biennio '97-'98 (U.S. Renal Data System 1999 Annual Report Preliminary Data)

BIOPSIE RENALI 1998/2001		
Gn Membranosa	52	22,8 %
Amiloidosi	19	8,3 %
Vasculiti	17	7,4 %
GN IgA (Berger)	13	5,7 %
GN Extracapillare	13	5,7 %
GNMP	13	5,7 %
GSFS	11	4,8 %
Diabete	19	3,9 %
Nefrite Interstiziale	8	3,5 %
Nefroangiosclerosi	7	3 %

Tabella 3: Risultati di biopsie in pz con IRC nel quadriennio 1998-2001

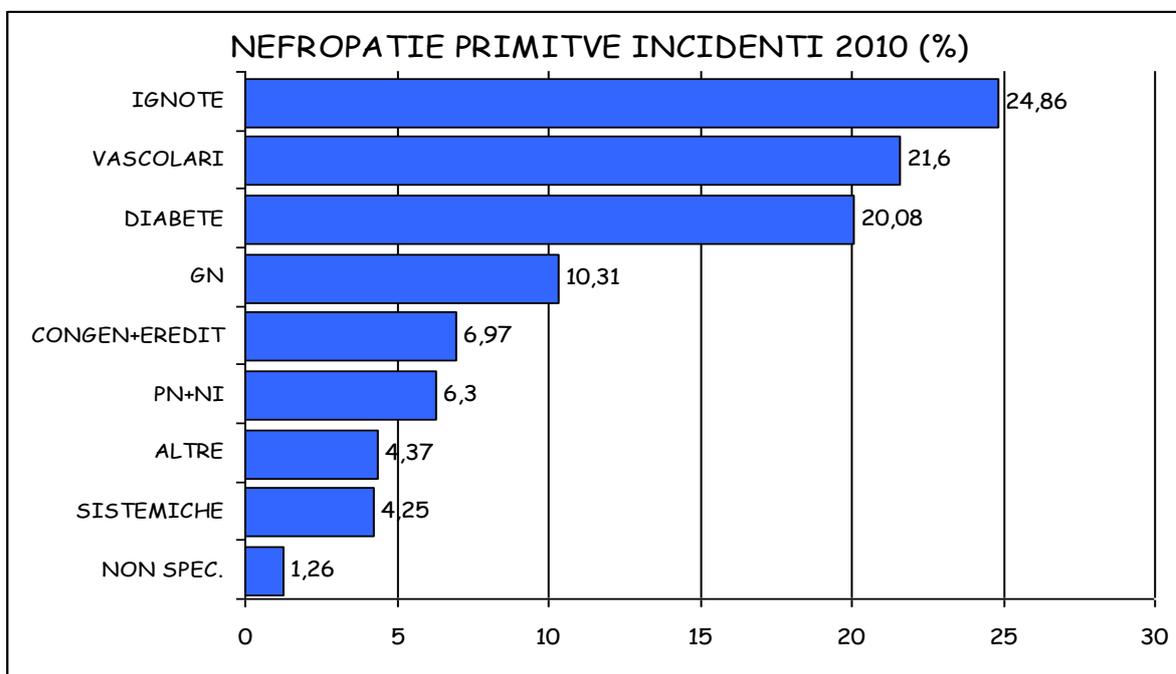


Figura 1: Incidenza delle principali patologie renali (RIDT)

GLOMERULONEFRITI PRIMARIE	NUOVI CASI/MILIONE/ANNO
Membrano-proliferativa	2,73
IgA	7,34
Membranosa idiopatica	4,41
Lesioni minime	3,49
Scleroialinosi focali	3,89
Proliferativi endo-capillare	1,2
Extracapillare	2,12
<i>Totali</i>	31,79

Tabella 4: Incidenza delle diverse tipologie clinico-istologiche di GNF primitive. (Giornale Italiano di Nefrologia/Vol.10 n.6, 1993)

1.3 - ETIOPATOGENESI DEL DANNO NELLE GLOMERULONEFRITI

Come già accennato precedentemente gran parte dei dati clinici e sperimentali supportano l'ipotesi che tutte le forme di glomerulonefrite risultano da un meccanismo immunologico [21-22-23-24]. Gli agenti eziologici nelle glomerulonefriti sono in larga parte sconosciuti, con l'eccezione degli agenti infettivi. Si ritiene che la maggior parte dei fattori precipitanti, come le infezioni o l'esposizione a farmaci o a tossine, possano iniziare come una risposta infiammatoria che mostra una via comune di formazione delle glomerulonefriti. La natura della risposta immunitaria che porta alla GN e gli elementi che ne provocano lo sviluppo sono molto probabilmente geneticamente determinati [25]. Esistono convincenti prove che la maggior parte delle GN sono una forma di malattie autoimmunitarie; infatti molti agenti eziologici causerebbero la GN come conseguenza di un'induzione della perdita della tolleranza ad antigeni self più che come risposta immune diretta agli agenti eziologici, come si osserva nelle malattie del siero [26].

La risposta immune nefritogenica generalmente esibisce sia componenti della *risposta umorale* che di quella *cellulare*. La prima porta alla formazione di depositi immuni a livello glomerulare, la seconda contribuisce all'infiltrazione da parte delle cellule infiammatorie circolanti dei glomeruli.

Sia gli eventi umorali che quelli cellulari attivano il rilascio di una serie di mediatori dell'infiammazione; questi mediatori sono i responsabili per il formarsi degli elementi funzionali (principalmente un aumento nella filtrazione delle proteine e una riduzione della quota di filtrazione glomerulare) e strutturali (ipercellularità, necrosi, trombosi, "crescent" e la sclerosi) che caratterizzano il quadro clinico ed istologico delle glomerulonefriti.

1.3.1 – Immunità umorale

La maggior parte delle patologie glomerulari sono caratterizzate dalla presenza di depositi di immunoglobuline e componenti del complemento a livello glomerulare, e ciò suggerisce che la risposta immune umorale è la principale causa del danno.

Alcuni esempi includono la GN post-infettiva, la nefropatia da IgA, la malattia da anticorpi anti-GBM, e alcune forme di GN rapidamente progressiva.

Nella maggior parte dei casi, il danno risultante dalla formazione di immunocomplessi si manifesta primariamente nei glomeruli perchè l'antigene bersaglio è situato in maniera predominante in queste strutture. Gli anticorpi che inducono i depositi immuni a livello glomerulare possono perciò essere diretti contro una delle seguenti strutture:

- I normali costituenti dei glomeruli, come l'antigene di Goodpasture su i domini non-collageni della catena alfa III del collagene di tipo IV [27].
- Antigeni self non renali localizzati nei glomeruli, come i complessi DNA-nucleosomi nel LES; questi antigeni si localizzano a livello glomerulare provocando come risultato di un'alterazione della parete capillare glomerulare.
- Antigeni esogeni che si localizzano a livello glomerulare attraverso: affinità elettrica per le strutture presenti in tale sede; intrappolamento passivo; precipitazione locale.

Le conseguenze strutturali e funzionali della formazione di immunodepositi nei glomeruli sono dipendenti da almeno quattro fattori [30]:

1. Il sito in cui i depositi si vengono a formare. Così, depositi nel mesangio glomerulare causano principalmente una proliferazione delle cellule mesangiali, un cambiamento di fenotipo, e un'espansione della matrice mesangiale [31]. Invece, depositi simili sulla superficie interna della parete capillare (depositi subendoteliali) sono principalmente nefritogenici in virtù della loro capacità di reclutare neutrofili circolanti e macrofagi come cellule effettrici attraverso meccanismi chemiotattici, di immuno-derenza e di adesione molecolare [32-33]. Inoltre, quando i depositi che possono anche contenere antigeni simili e immunoglobuline esternamente, o a livello subendoteliale, "surface" della parete capillare, non inducono infiammazione. Ciò avviene perché si formano in siti inaccessibili alle cellule circolanti e i peptici chemiotattici derivanti dal complemento sono mossi dalle forze di filtrazione nello spazio urinario più che attraverso il lume capillare [34].

2. Le proprietà immunologiche delle immunoglobuline che formano i depositi. Un esempio, i sottotipi di IgG fissanti il complemento, come le IgG1 e le IgG3, causano un danno maggiore che gli anticorpi che attivano debolmente il complemento (eg, IgA) [35].
3. Il meccanismo tramite cui si vengono a formare gli immuno-depositi. Quando l'interazione antigene-anticorpo prende posto nel glomerulo stesso (formazione di immuno-complessi in situ), il processo sfocia in un'attivazione locale del complemento; questa forma di interazione ed attivazione è molto più nefritogena dell'intrappolamento passivo di complessi circolanti similari [30].
4. L'ammontare degli immuno-depositi formati. Più immuno-depositi si formano tanto maggiore sarà il danno.

Sono poche le prove che mostrino che le immunoglobuline stesse abbiano effetti diretti nell'indurre danni tissutali, indipendentemente da come o dove gli immunocomplessi si formino nei glomeruli. Inoltre, il danno in genere si forma come conseguenza dell'attivazione e del rilascio di una serie di mediatori dell'infiammazione. Questi includono l'attivazione del complemento indotta dagli anticorpi stessi, ossidanti e proteasi rilasciate sia dalle cellule dell'infiammazione che da quelle proprie del glomerulo, e una varietà di citochine, fattori di crescita agenti vasoattivi che avviano una serie di eventi concatenati che vedono come risultato finale le alterazioni strutturali e funzionali tipiche delle patologie glomerulari.

1.3.2 – Immunità cellulare

Esistono prove convincenti a sostegno di un ruolo primario delle cellule mononucleate nel causare disturbi come nella Sindrome nefrosica con lesioni minime/glomerulosclerosi focale (MCNS/FGS) e nelle GN idiopatiche (ANCA-positive) rapidamente progressive (RPGN), anche in assenza di depositi di anticorpi. Presumibilmente, principi similari a quelli osservati nei processi umorali possono essere riportati anche per descrivere i meccanismi di danno immunitario cellulo-mediato; comunque poco si sa dei dettagli dei processi cellulo-mediati a

livello glomerulare. Alcune prove sono a supporto di un ruolo delle cellule T nella patologia glomerulare [36].

1.4 - MECCANISMI DI DANNO IMMUNITARIO AI GLOMERULI

Il danno glomerulare di origine immunologica si esplica attraverso l'azione di più elementi del sistema immunitario, come risulta da diverse manifestazioni cliniche ed immunologiche [37]. Con il coinvolgimento infiammatorio del rene, per esempio, l'ipercellularità glomerulare è dovuta all'infiltrazione delle cellule ematopoietiche (come neutrofili e macrofagi), proliferazione di cellule glomerulari, o entrambi. Queste lesioni possono essere accompagnate da altri elementi, quali la trombosi, la necrosi e la formazione delle "semilune crescentiche", che, se estese, possono sfociare in un'insufficienza renale rapidamente progressiva e in una nefrite. Dagli studi effettuati è emerso che le lesioni non infiammatorie derivate dal danno immunitario sono associate con un maggiore cambiamento funzionale dei glomeruli (in genere un aumento della permeabilità alle proteine), ma senza delle prove microscopiche di danno. Ciò si verifica soprattutto nelle sindromi nefrosiche.

1.4.1 – Meccanismi non infiammatori di danno glomerulare

Sia le sindromi nefrosiche a lesioni minime/glomerulosclerosi focali (MCNS/FGS) che la nefropatia membranosa sono caratterizzate inizialmente da un drammatico aumento della permeabilità glomerulare in associazione con poca o nessuna infiltrazione e proliferazione cellulare. In entrambi i gruppi di patologie il principale bersaglio del danno immunitario sembrano essere le cellule epiteliali glomerulari (GEC).

Fattori di permeabilità glomerulare: L'esistenza di fattori non immunologici nelle MCNS/FGS è stata postulata già nel 1974 da Shalhoub il quale avanzò la teoria secondo la quale tali sindromi nefrosiche idiopatiche rappresenterebbero "un'anormalità sistemica" nella funzione dei linfociti sfociante nella secrezione di

mediatori tossici circolanti diretti verso una innocente, dal punto di vista immunologico, membrana basale glomerulare (GBM). Tale teoria ha trovato appoggio sulla base delle seguenti osservazione [38-39]:

- La veloce ricorrenza di MCNS e FGS in reni normali trapiantati in pazienti con questi disordini;
- La capacità del siero di pazienti con FGS di aumentare la permeabilità all'albumina in glomeruli normali isolati in vitro [40];
- La rapida regressione delle alterazione patologiche quando reni con MCNS vengono messi in cavie normali;
- Lo sviluppo di tale patologie associate in maniera stretta ai Linfomi Hodgkin.

Sulla scorta di questi dati si è quindi formata l'idea della presenza del cosiddetto **Fattore di Permeabilità**.

L'attività del FP nelle FGS è definita come la capacità del plasma di pazienti con tale patologia di incrementare la permeabilità all'albumina (P_{alb}) in glomeruli isolati, o può anche essere valutata in base alla variazione di volume glomerulare (GVV)

L'esatto meccanismo tramite cui i fattori di permeabilità inducono le alterazioni glomerulari non sono ancora stati scoperti, ma si ritiene che questi siano incentrati sulle GEC (i podociti), dal momento che l'unica lesione strutturale osservata nella MCNS coinvolge proprio queste cellule. Tale ipotesi è rafforzata dall'osservazione che la somministrazione di anticorpi diretti contro antigeni selettivi per le GEC causa un massivo aumento della permeabilità glomerulare. Inoltre, le lesioni causate da questi anticorpi, osservabili al microscopio elettronico, sono simili a quelle osservabili nel MCNS [43].

Più recenti osservazioni, ottime per chiarire ulteriormente tale discorso, sono le seguenti:

- Identificazione di due proteine, la *nefrina* e il *CD2AP*, associate con le "slit pore diaphragm" [44-45];
- L'osservazione che almeno uno degli anticorpi monoclonali che induce una lesione come MCNS nelle cavie è diretto contro la nefrina [46];

- La dimostrazione che l'espressione di nefrina alterata è osservabile in un modello animale di Sindrome Nefrosica [47] e in altri disturbi di tipo nefrosico come la MCNS e la Sindrome Nefrosica Congenita [48].

Si è visto, inoltre, che l'attività del FP si riduce con la plasmateresi o l'immunoassorbimento, e può venire recuperato dagli scarti del plasma.

Il plasma normale, inoltre, contiene sostanze capaci di bloccare o inattivare il fattore di permeabilità nelle FSGS. Anche alcuni agenti farmacologici, tra cui la ciclosporina e l'indometacina, bloccano l'attività del fattore di permeabilità in vitro. L'osservazione che il FP può essere bloccato da diversi agenti ha fatto nascere la speranza che specifiche terapie per la FSGS in particolare, e le GNF in generale, possano essere formate.

LEGAME COMPLEMENTO-MAMBRANA: Nella nefropatia membranosa (MN) lo sviluppo di immuno-depositi (IgG, C3, C5b-9) subepiteliali provoca ampie alterazioni nella permeabilità glomerulare alle proteine senza però mostrare significative alterazioni anche sul piano istologico [48]. Un tentativo per capire i meccanismi attraverso i quali la MN si forma sono in gran parte incentrati su studi sul modello di MN della Nefrite di Heymann nei topi, che è un modello di alterazione che è sul piano patologico, immunopatologico e funzionale indistinguibile dalla controparte umana.

Nella nefrite di Heymann, i depositi subendoteliali si sviluppano come conseguenza dell'unione in situ di anticorpi IgG a strutture antigeniche localizzate nei "Clathrin-coated pits" delle GEC (ora rinominate *Heymann Nephritis Antigenic Complex* o HNAC) [50]. Una volta formati prima gli aggregati immunitari e poi, in seguito al legame con le GEC, gli immuno-complessi di superficie, si ha l'attivazione del complemento; C3 e C5b-9 sono in genere i costituenti dei depositi [51]. Diversamente dal complesso antigene-anticorpo, che si trova esposto sulla superficie della cellula, C5b-9 attraversa la membrana delle GEC e viene trasportato attraverso la cellula fino ad insinuarsi nello spazio urinario [52].

Attualmente si ritiene che il C5b-9 sia il principale mediatore dei cambiamenti nella funzionalità della barriera glomerulare nelle MN; questa conclusione è basata su studi sperimentali dimostranti che la deplezione selettiva o l'assenza genetica di alcune componenti del complemento terminale riducono grandemente la

capacità degli anticorpi anti-GEC di indurre proteinuria in animali, in reni isolati perfusi e in glomeruli isolati [53].

Il meccanismo del complesso C5b-9 che conduce agli effetti sublitici sulle GEC e che dà proteinuria è principalmente legato alla produzione di perossido di idrogeno [54]; questa tossina causa un danno diretto alla sottostante GMB. In aggiunta, anche l'aumentata produzione da parte delle GEC di un'unica proteasi degradante la GMB si ha in risposta al C5b-9 [55]. C5b-9 provoca inoltre una up-regulation della sintesi del DNA delle GEC [56] e l'espressione di TGF β -2 e TGF β -3 e i recettori per il TGF sulle GEC stesse; questi cambiamenti portano ad un'iperproduzione di matrice cellulare che conduce all'ispessimento della membrana basale glomerulare e la formazione di "spike" [57]. L'aumentata escrezione del C5b-9 con le urine a livello sperimentale segue di pari passo l'andamento della formazione degli immuno-depositi [58]. L'aumento dei livelli del complemento si è osservato anche nelle MN umane [59].

Sebbene gli immuno-depositi nello spazio subepiteliale attivino il complemento, non ci sono influssi di cellule infiammatorie nelle MN, dal momento che i fattori chemiotattici generati sono separati dalla circolazione dalla GMB. Di conseguenza il danno viene ampiamente limitato alle cellule epiteliali glomerulari.

Mentre gli studi sul ruolo del C5b-9 nei disturbi glomerulari si sono focalizzati principalmente sulle GEC, per cui esistono prove convincenti che la formazione del complesso d'attacco della membrana sia anche responsabile del danno immunitario alle cellule mesangiali ed endoteliali [60-61].

FORMAZIONE DELLE "CRESCENT" GLOMERULARI: La presenza di crescent nei glomeruli è un marker istologico di danno severo. In genere, la severità del danno è correlato con la percentuale di glomeruli che esibiscono crescent [86-89]. In aggiunta, la durata e la potenziale reversibilità della sottostante patologia corrisponde alla relativa predominanza della componente cellulare o fibrosa.

Sebbene la GN crescente è più comunemente una forma di GN rapidamente progressiva (RPGN), queste lesioni possono presentarsi maggiormente come forme di danno glomerulare di tipo infiammatorio. Questo include le GN post-infettive, la nefropatia da IgA, LES, vasculiti, e le glomerulonefriti membranoproliferative (MPGN).

EVENTI INIZIANTI: gli eventi iniziati nella formazione di tutte le crescent glomerulari è lo sviluppo di uno spazio fisico, un gap, un buco, nella membrana basale glomerulare (GMB) [90]. Recentemente è stato riconosciuto che simili buchi anche a livello della capsula di Bowman sono correlati con la formazione di crescent [91-92]. Queste lesioni sono presumibilmente mediate da processi primariamente coinvolgenti macrofagi e cellule dell'immunità cellulo-mediata, come già accenno precedentemente.

Quando arriva come un'interruzione dell'integrità dei capillari glomerulari, le cellule circolanti, i mediatori dell'infiammazione, e le proteine plasmatiche, passano attraverso la parete capillare e arrivano nello spazio di Bowman. Analogamente, gli spazi nella capsula di Bowman permettono alle cellule e ai mediatori di passare dall'interstizio allo spazio di Bowman. Lo sviluppo di una crescent risulta conseguenziale alla partecipazione di fattori di coagulazione, in particolar modo la fibrina, e una serie di cellule proliferanti, inclusi i macrofagi, le cellule dell'endotelio glomerulare, e fibroblasti interstiziali.

FORMAZIONE E COMPOSIZIONE: le semilune sono definite per convenzione come la presenza di due o più file/strati di cellule nello spazio di Bowman. I podociti non sono in genere chiamati in causa nella partecipazione alla formazione delle mezzelune. I maggiori responsabili sono invece le proteine della coagulazione, i macrofagi, le cellule T, i fibroblasti e le cellule epiteliali parietali.

A) **PROTEINE DELLA COAGULAZIONE:** elemento centrale alla formazione della maggior parte delle mezzelune è la presenza nello spazio di Bowman di fattori della coagulazione che portano all'intrecciarsi della fibrina. L'importanza della fibrina è illustrata dal fatto che la completa defibrinazione previene la formazione dei crescent [93-94]. Le molecole pro-coagulanti che svolgono ruolo centrale in tale processo sono le seguenti:

- Tissue factor
- Tissue factor inhibitor
- Plasminogen/plasmin system

1. **Fattore tissutale:** il principale stimolatore per il depositarsi di fibrina sembra essere il Fattore tissutale, una proteina da 31 kD che lega e attiva il fattore

VII. Tale proteina deriva dalle cellule endoteliali, le cellule epiteliali glomerulari, e i macrofagi. Anche l'Interleuchina-1 (IL-1) e il Tumor Necrosis Factor (TNF) derivati dai macrofagi ne stimolano la produzione dalle cellule dell'endotelio glomerulare. Nelle GN precoci l'espressione del Fattore Tissutale sembra derivare dalle residenti cellule glomerulari; più tardi, invece, originano principalmente dai macrofagi [95].

2. Inibitori del fattore tissutale: L'aumento dell'attività del fattore tissutale è accompagnato da una precoce riduzione del TFPI, favorendo in tal modo la deposizione della fibrina. La somministrazione di TFPI ricombinante riduce significativamente la deposizione di fibrina nonché la formazione delle mezzelune. Questa risposta precoce è seguita dall'amplificazione dell'espressione del TFPI nella fase finale della patologia, inibendo in modo cronico proprio il depositarsi della fibrina [98-99].
3. Sistema plasminogeno/plasmina: il sistema plasminogeno/plasmina è punto centrale della fibrinolisi e della risoluzione delle mezzelune. Nelle GN sperimentali, per esempio, c'è una ridotta attività fibrinolitica legata ad una riduzione del tPA, e ad un aumento dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) [99]. Il risultato finale è che i filamenti di fibrina extraglomerulari arriva fino allo spazio di Bowman. Da ricordare, infine, che la fibrina è un potente fattore chemiotattico che può anche favorire il reclutamento dei macrofagi nell'ambiente glomerulare [101].

B) MACROFAGI: i macrofagi, che presumibilmente arrivano dalla circolazione, hanno ruolo centrale nella formazione delle mezzelune, visti che sia l'espressione del fattore tissutale che la deposizione di fibrina sono fenomeni macrofago-dipendenti [102]. La localizzazione di tali cellule a livello glomerulare vede coinvolti multipli fattori chemiotattici, tra cui la fibrina, la MCP-1, il MIF, e il MIP-1- α e l'osteopontina [103-106], e alcune molecole di adesione, come le VCAM-1, le ICAM-1, e la CD44, tutte espresse sulle cellule parietali [107-108]. L'espressione dei recettori per la MCP-1, e del recettore 2B per le chemochine (CCR2B), possono risultare particolarmente importanti nella genesi della localizzazione glomerulare dei macrofagi [109]. Una volta avvenuta la

localizzazione a livello dello spazio di Bowman, i macrofagi attivati contribuiscono alla proliferazione dei crescent, e al rilascio delle seguenti molecole:

- Procoagulant tissue factor.
- Interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) [25].

Queste due citochine danno una sovraespressione delle molecole di adesione, stimolano la proliferazione cellulare, e reclutano più macrofagi. Il blocco selettivo dell'IL-1 con un antagonista del suo recettore, e del TNF con recettori solubili, riduce marcatamente la formazione delle mezzelune. Il TNF in particolare è un potente stimolo per la produzione di collagene I da parte di alcune cellule e probabilmente media parzialmente la transizione da mezzelune cellulari poi fibrocellulari e infine fibrose. La somministrazione di un recettore solubile chimerico per il TGF migliora la formazione della matrice extracellulare in un modello animale di glomerulonefriti [110-111-112-113-114].

I macrofagi penetrano nello spazio di Bowman oltre che dal circolo sistemico anche attraverso l'interstizio periglomerulare passando per soluzioni di continuità nella capsula di Bowman, interruzioni causate da processi infiammatori similari a quelli che risultano nelle rotture della GMB. I gap in questa regione anatomica potrebbero rappresentare lesioni derivate da processi cellulo-mediati [115-116].

C) CELLULE T: sono state trovate le cellule T nello spazio di Bowman e nelle mezzelune, ma non ne sono una componente prominente. Invece il loro principale ruolo nel danno glomerulare può essere il riconoscimento dell'antigene e il reclutamento dei macrofagi (attraverso il rilascio di fattori come il MIF e l'INF- γ). Nonostante manovre come la deplezione delle cellule T, il blocco del MIF, e la delezione del gene per l'interferon-gamma (INF- γ), riducano in modo sostanziale la formazione delle mezzelune, questo fatto probabilmente riflette una riduzione nella severità del danno macrofago-mediato a livello intercapillare (forse anche periglomerulare) e non un ruolo diretto delle cellule T.

D) FIBROBLASTI: In alcuni esempi di GN da semilune, il secondo principale tipo di cellule chiamato in causa è quello dei fibroblasti. Si pensa che queste cellule entrino nello spazio di Bowman dall'interstizio periglomerulare attraverso fessure nella capsula di Bowman. Nelle mezzelune i fibroblasti sono la maggiore sorgente di collagene interstiziale (o tipo I) che caratterizzano la transizione dai crescent

cellulari a quelli fibrosi. La proliferazione dei fibroblasti è dipendente da elementi simili a fattori di crescita, probabilmente coinvolgente il fattore base di crescita dei fibroblasti (bFGF) [91-92-101-119].

E) CELLULE DELL'EPITELIO PARIETALE: sebbene i macrofagi siano uno dei tipi cellulari fondamentali nella formazione delle semilune, anche le cellule dell'epitelio parietale sono una componente significativa. Diversamente dalle GEC, o podociti, che sono cellule differenziate allo stato terminale con una piccola capacità proliferativa, quelle dell'epitelio parietale hanno alta potenzialità proliferativa e che si esprime, presumibilmente, in risposta ai fattori di crescita, come il PDGF e il bFGF; la proliferazione delle cellule epiteliali parietali potrebbe essere facilitata dalla ridotta espressione degli inibitori della ciclinchinasi [120].

RISOLUZIONE DELLA FORMAZIONE DEI CRESCENT: la presenza delle mezzelune non porta a danni glomerulari irreversibili. Nelle nefropatie da IgA, per esempio, la maggior parte dei glomeruli può mostrare semilune cellulari durante episodi di macroematuria, ma le lesioni si possono risolvere con lievi o nessuno strascico. Questa linea di progressione si ha quando le semilune sono soprattutto di tipo cellulare, senza una significativa componente di fibroblasti o di collagene.

La progressione o la risoluzione di tali formazioni potrebbe dipendere dall'integrità della capsula di Bowman e dalla risultante componente cellulare dei crescent. La progressione di collagene interstiziale e la progressione verso le semilune fibrose è più comune quando si verifica la rottura della capsula ed i fibroblasti, insieme ai macrofagi, sono vicino allo spazio di Bowman. Sebbene la presenza dei crescent fibrosi sia collegata alla glomerulosclerosi, non si hanno prove convincenti che la loro formazione sia la causa del danno ai capillari glomerulari.

Un esempio di ciò è dato dal fatto che la defibrinazione elimina la formazione delle semilune senza però dare miglioramenti della funzionalità renale. Sembra piuttosto che la formazione dei crescent sia una conseguenza del danno capillare. Comunque una migliore capacità di comprensione del processo del danno glomerulare mediato da meccanismi dell'immunità cellulo-mediata, che rivolge l'attacco sia dai siti periglomerulari che da quelli intercapillari, potrebbe

supportare le ipotesi che gli eventi infiammatori nello spazio di Bowman potrebbe provocare danni ai capillari come quelle alterazioni dei capillari stessi [122].

RUOLO DELL'ALBUMINA: L'incremento dell'albuminuria è uno dei più importanti e significativi markers di danno glomerulare. Si crede che la proteinuria possa portare alla formazione di lesioni renali come risultato di un maggiore carico di proteine filtrate a livello dei tubuli prossimali. Questo sovraccarico di filtrazione a livello delle cellule tubulari da parte delle proteine dovrebbe indurre l'espressione di un genotipo e fenotipo infiammatorio, portando così ad una progressiva fibrosi e atrofia tubulare. Gli effetti tossici sono stati ascritti al legame dell'albumina con acidi grassi, con altre molecole di albumina o con altre proteine in genere legate ad essa, come la transferrina o i fattori del complemento. Inoltre alcuni gruppi di studio hanno dimostrato che in pazienti con alterazioni glomerulari, la preferita escrezione delle proteine a più alto peso molecolare rispetto all'albumina, la così detta "proteinuria non selettiva" (in contrasto con la "proteinuria selettiva" formata dall'albumina), si correla meglio con la severità della lesione istologica e può predire in modo migliore l'evoluzione rispetto a quanto faccia l'albuminuria. E' da sottolineare, inoltre, che nelle glomerulopatie a lesioni minime (MCG), le quali mostrano una proteinuria massiva ed altamente selettiva, la prognosi è generalmente buona. In opposizione, Ghiggeri et al. hanno scoperto che l'albuminuria nelle MCG era molto meno legata agli acidi grassi, in particolare all'acido linoleico ed oleico, piuttosto che l'albuminuria presente nei pazienti senza MCG. E' stato recentemente dimostrato che, tra gli acidi grassi che si legano all'albumina, l'acido linoleico sarebbe quello più tubulotossico, e l'acido oleico invece sarebbe quello più fibrogenico. E' stato inoltre oggettivato che la durata della proteinuria nelle MCG, dovuta alla sua sensibilità alla terapia steroidea, è in genere relativamente più corta. Perciò, nelle MCG, periodi di elevato traffico proteico è piuttosto limitato nel tempo. Presi contemporaneamente, comunque, ci sono buone prove che indicano che il sovraccarico tubulare da parte delle proteine, e dell'albumina stessa, possa non essere il fattore primario responsabile della progressione del danno renale. Infatti la proteinuria non selettiva, attualmente, sembra rifletta un maggiore grado di severità di lesione a livello

glomerulare, e ciò potrebbe indicare che le proteine filtrate con peso molecolare maggiore dell'albumina potrebbero essere più deterioranti la funzione tubulare, rispetto all'albumina stessa [19].

1.4.2 - Meccanismi infiammatori di danno glomerulare

Un'imponente risposta cellulare è generalmente osservata nelle malattie renali in cui si formano immuno-depositi a livello della GMB, sulla superficie interna della parete capillare (depositi subendoteliali), o a livello del mesangio. Questi complessi avviano una serie di multipli processi infiammatori, in particolar modo l'attivazione del complemento, il rilascio di citochine, e la generazione di fattori chemiotattici. Diversamente dai prodotti risultanti dalla deposizione di immuno-complessi subepiteliali nella MN, questi hanno accesso allo spazio vascolare, dando quindi infiltrazione da cellule infiammatorie (neutrofili, linfociti e macrofagi); anche le cellule glomerulari proliferano, in particolar modo le cellule mesangiali.

L'importanza dell'attivazione del complemento e delle citochine può essere illustrato dalle seguenti osservazioni:

- Le nefriti da immuno-complessi vengono decisamente migliorate nei topi transgenici che esprimono in maniera massiva un inibitore del complemento nel plasma e nei topi in cui i geni per le componenti del complemento C3 e C4 sono stati deleti.
- Le nefriti da immuno-complessi e l'infiltrazione da parte delle cellule infiammatorie associate sono notevolmente ridotte dalla somministrazione di anticorpi diretti contro il fattore di inibizione della migrazione macrofagica.
- La nefrite da anticorpi anti-GMB si riduce drasticamente nei topi deficienti per il recettore dell'Angiotensina-IIa, suggerendo così l'importanza dell'angiotensina-II nell'iniziare il danno immunitario.

NEUTROFILI: I neutrofili sono presenti nelle biopsie precoci di pazienti GN post-streptococcica, nelle GN membranoproliferative, nella Porpora di Henoch-Schonlein (HSP), nel Lupus eritematoso sistemico (LES), e in alcune forme di GlomeruloNefrite Rapidamente Progressiva (RPGN). Come nella maggior parte dei

processi infiammatori, la localizzazione dei neutrofili a livello dei capillari glomerulari è dipendente dalla generazione dei fattori chemiotattici all'interno e intorno il focolaio infiammatorio; i principali fattori chemioattenti nelle patologie glomerulari sono il C5a (derivato dall'attivazione del complemento) e alcune, chemochine quali l'interleuchina-8. La localizzazione inoltre coinvolge l'interazione tra le molecole di adesione espresse dalle cellule dell'endotelio glomerulare, come le selectine, le integrine (CD11/CD18), e le ICAM-1, e i loro corrispondenti ligandi sui neutrofili [114-120].

Una volta localizzati nel sito dove si è formato l'immuno-deposito, i neutrofili tentano di ingerire gli aggregati di immuno-complessi per rimuoverli; sono successivamente attivati, andando incontro ad un'esplosione ossidativa e generando così specie reattive dell'ossigeno. Studi successivi hanno dimostrato che è il perossido di idrogeno il principale ossidante derivante dai neutrofili che media il danno glomerulare. Il perossido di idrogeno è una sostanza nefritogena, interagisce con un altro enzima cationico mieloperossidasi derivato dai neutrofili (che è in grado di localizzarsi anche a livello glomerulare per via della sua carica elettrica) e inoltre è in grado di formare acidi in grado di alogenizzare la parete capillare glomerulare [118-119].

I neutrofili sono inoltre in grado di rilasciare alcune proteasi seriniche, quali l'elastasi e la catepsina G, attraverso granuli azzurrofilari. L'attivazione dei neutrofili all'interno dei glomeruli causa il rilascio nell'ambiente extracellulare di queste proteine, da cui poi deriva la degradazione degli elementi della membrana basale glomerulare. In uno studio sul siero nefrotossico di ratti con nefrite, il pretrattamento con inibitori dell'elastasi ha soppresso in maniera significativa il danno glomerulare e la formazione dei crescent.

MACROFAGI: Anche i macrofagi svolgono un ruolo importante nella formazione di alcune lesioni glomerulari, tra cui alcune forme di RPGN, SLE, e la nefropatia da crioglobuline. I macrofagi si localizzano a livello glomerulare attraverso l'interazione sia con i depositi di immunoglobuline (tramite il recettore per Fc) che con alcune chemochine, quali le *macrophage chemoattractant protein-1* (MCP-1) e la *macrophage inflammatory protein-1alpha* (MIP-1alpha). Diversamente dai neutrofili, i macrofagi sono anche soggetti a un sistema di controregolazione che

prontamente li elimina, mediato da molecole di origine linfocitaria, come il *fattore di inibizione macrofagica* (MIF), che si esplica attraverso l'interazione tra cellule T specificamente sensibilizzate e antigeni intraglomerulari. In aggiunta si ha una localizzazione in questa sede attraverso l'interazione con molecole di adesione leucocitaria, come le ICAM-1 e le VCAM-1, o come l'osteopontina [74-75].

Così i macrofagi possono funzionare come cellule effettrici nei danni da reazione sia cellulomediata che umorale, e sono i maggiori responsabili nelle lesioni glomerulari indotte dalle cellule T sensibilizzate in assenza di anticorpi. Così come i neutrofilii, anche i macrofagi possono generare ossidasi e proteasi; ma, diversamente da questi, rilasciano anche il fattore tissutale (che contribuisce alla deposizione di fibrina e alla formazione delle semilune) e TGF (che contribuisce alla sintesi di matrice extracellulare e all'eventuale evoluzione della sclerosi). Sono inoltre la componente cellulare più presente nei crescent.

LINFOCITI T: Le cellule T sono raramente presenti in grandi quantità nelle lesioni glomerulari, ma sono comunque riscontrabili, specialmente nelle patologie principalmente mediate dai macrofagi. Sebbene ci siano prove sperimentali che il danno glomerulare possa essere indotto dai linfociti T in assenza di deposizione di anticorpi, sono poche le prove che dimostrino che tali cellule siano da sole nefritogeniche. Invece, le lesioni mediate dalle cellule T sono principalmente legate al rilascio di chemochine e al reclutamento dei macrofagi, che conseguentemente fungono da cellule effettrici.

DANNO INDOTTO DALL'ATTIVAZIONE E/O PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE RESIDENTI A LIVELLO GLOMERULARE:

Diversamente dalle lesioni derivate da processi non infiammatori legati alle GEC, le alterazioni nelle quali sono principalmente coinvolte le cellule del mesangio e quelle endoteliali, mostrano una maggiore severità nella risposta al danno immune. Tale risposta è in genere caratterizzata dalla proliferazione delle cellule e da modificazioni fenotipiche, così com'è chiaramente visibile nei cambiamenti strutturali osservabili nelle biopsie renali.

Le cellule endoteliali glomerulari (GEC) sembrano essere i principali bersagli di insulto in alcune patologie, come la sindrome uremico-emolitica e le vasculiti.

L'insulto alle GEC può indurre proliferazione, cambio di fenotipo (espressione di molecole di adesione), rilascio di agenti vasoattivi (endotelina ed ossido nitrico) e la conversione in uno stato protrombotico [77-78]. E' comunque da sottolineare che in realtà attualmente è ancora poco conosciuto sulle conseguenze in vivo che subiscono le strutture e la funzionalità glomerulari in seguito a insulto alle GEC.

Molta più attenzione bisogna porre sulle cellule mesangiali in quelle patologie in cui proprio il mesangio è coinvolto; ciò è molto più comune quando si ha formazione di immuno-depositi in tale sede, cosa osservabile nelle Nefropatie da IgA, nell'HSP, nella SLE, e in altre patologie ancora.

In seguito a studi in coltura delle cellule del mesangio glomerulare è stata scoperta e studiata una lunga lista di mediatori che possono attivare tali cellule [79]:

- Citochine, come l'interleuchina-1 (IL-1) e il tumor necrosis factor (TNF)
- Fattori di crescita, come il Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e il il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)
- C5b-9
- Immuno-complessi

La risposta del mesangio all'insulto è caratterizzato dalla proliferazione, modificazioni fenotipiche (miofibroblasti actina-positivi), e produzione di matrice extracellulare. Il PDGF sembra sia il principale mediatore responsabile della proliferazione delle cellule mesangiali nelle patologie glomerulari; inoltre i recettori per questa proteina risultano anche sovraespressi.

La proliferazione mesangiale è associata ad un aumento dell'espressione di chinasi ciclina-dipendente e ad una riduzione di inibitore di tali enzimi, come il P21 e il P27. Prove consistenti attualmente suggeriscono che la proliferazione mesangiale è precorritrice essenziale della successiva espansione della matrice mesangiale e della sclerosi, legate soprattutto all'azione del TGF [78-79-80-84].

1.5 – TERAPIA

Considerata la diversità istologiche delle diverse GNf la terapia non esiste una terapia univoca, ne viene considerata efficace per talune forme istologiche.

1.5.1 – Terapia delle sindrome nefritica

- In passato è stata certamente sopravvalutata l'importanza terapeutica dell'assoluto *riposo a letto*. Laddove infatti è opportuno tenere a letto i pazienti nelle fasi iniziali di una sindrome nefritica acuta conclamata, quando quindi sono presenti ipertensione, ritenzione idroelettrica ed iperazotemia; appare invece privo di utilità un riposo assoluto per mesi di un paziente dopo una sindrome nefritica acuta in attesa di scomparsa definitiva degli elementi del sedimento urinario (che talvolta nemmeno si realizza)
- Anche delle *restrizioni dietetiche* si è spesso abusato. E' utile la riduzione dell'apporto di sodio durante la fase di ritenzione idrica con oliguria e per tutta la durata dello stato di ipertensione arteriosa. Si ritiene invece opportuna la riduzione dell'apporto proteico soltanto se esiste una grave ritenzione di azotata, e limitatamente alla durata della stessa. In assenza, quindi, di ipertensione ed iperazotemia, la dieta del paziente con sindrome nefritica acuta deve essere libera e ricca di proteine. La protratta restrizione dell'apporto proteico, infatti, non influenza positivamente la guarigione clinica delle glomerulonefriti acute ed è quindi inutile in assenza di un'insufficienza filtratoria importante
- Altra norma terapeutica controversa è il *trattamento dell'infezione* cui si presume sia imputabile il processo nefritico. L'uso dell'antibiotico a dosi piene in fase acuta e della profilassi penicillinica in fase di convalescenza è giustificabile nel caso della GNF post-infettiva (specialmente nella post-streptococcica). Non è invece dimostrato che tale terapia possa ridurre la gravità o prevenire l'insorgenza della nefropatia.

Sulla base delle conoscenze attuali sul ruolo della coagulazione nella patogenesi delle glomerulonefriti appare oggi del tutto privo di fondamento, e non scevro di rischi, l'uso di farmaci generalmente "coagulanti e/o capillaroprotettori", nel tentativo di ridurre l'ematuria, macroscopica e microscopica.

Possiamo quindi concludere che:

- a) L'uso di farmaci *diuretici, di antiipertensivi ed eventualmente di cardiotonici*, è necessario nelle fasi acute delle sindromi nefritiche. Tra i diuretici andranno preferiti la furosemide e l'acido etacrinico: questi farmaci, infatti, oltre ad esercitare una marcata azione inibitrice del riassorbimento tubulare del sodio in condizioni di normale funzionalità renale, hanno anche il vantaggio di conservare la loro azione sodiuretica anche in presenza di deficit cospicui della funzionalità renale; occorrerà, però, in tali circostanze, aumentare il dosaggio fino a trovare la dose adeguata.
- b) Se la fase di oliguria, con ritenzione azotata, dura a lungo, è sempre necessario ricorrere alla *terapia dialitica* [122].

1.5.2 – Terapia della sindrome nefrosica

- Il riposo a letto è necessario nella fase conclamata della sindrome nefrosica. Eliminati però gli edemi, e corretto l'apporto proteico, i pazienti, anche se affetti da glomerulonefriti cronche evolutive, debbono riprendere una vita il più possibile normale.
- La dieta deve essere marcatamente iposodica ed iperproteica. E' raccomandabile un introito giornaliero di 2g di proteine per Kg di peso, da ridursi a non meno di 1g anche in caso di concomitante deficit filtratorio. La riduzione troppo marcata, infatti, può provocare a lungo termine, a causa della perdita urinaria delle proteine, deficit nutrizionali gravi, oltre ad un aggravamento dell'ipoproteinemia.
- Per la correzione dell'ipoproteinemia, nella fase conclamata vengono frequentemente usate le infusioni di soluzioni concentrate di albumina povera di sale (50 g/die per un numero variabile di giorni).
- Per la correzione della ritenzione idroelettrica è molto efficace l'uso dei moderni diuretici (furosemide ed acido etacrinico). Se non si ha un deficit filtratorio può essere opportuno associare a questi farmaci un antialdosteronico, quale lo spironolattone, dato l'iperaldosteronismo spesso presente in questi pazienti.
- La terapia dell'ipertensione arteriosa si realizza con l'uso degli abituali farmaci antiipertensivi, possibilmente ricorrendo, nelle forme più gravi, ad associazioni

di più farmaci (clonidina, α -metildopa, β -bloccanti e furosemide) a dosaggi ridotti, per conservare l'effetto farmacologico e ridurre nel contempo gli effetti collaterali.

1.5.3 – Terapia specifica delle GNF primitive

Un'impostazione razionale della terapia specifica delle glomerulonefriti deve tener conto di tutti i meccanismi che entrano in gioco nella patogenesi della malattia e che sono stati ampiamente discussi precedentemente.

Pur non essendo forniti attualmente di dati completi sull'esatta natura della reazione antigene-anticorpo che sono alla base delle lesioni glomerulari, si possono comunque individuare due modalità di intervento terapeutico, nel tentativo di influenzare:

- la formazione dei complessi antigene-anticorpo
- la risposta infiammatoria che ne consegue.

a) Possibili modalità di intervento sulla formazione dei complessi antigene-anticorpo

L'obiettivo più importante da raggiungere, agendo su questa tappa del meccanismo patogenico, è quella di evitare la formazione iniziale di immunocomplessi, di impedirne la continua produzione nel tempo e, infine, di alterarne le caratteristiche fisico-chimiche fino a privarli dell'azione biologica sul rene.

Le prime due modalità di intervento presuppongono la conoscenza dell'antigene e la sua capacità di determinare, una volta giunto in contatto con l'organismo, la produzione di anticorpi e quindi di immunocomplessi potenzialmente nefritogeni.

Evitare un'esposizione all'antigene è quindi realizzabile solo in termini epidemiologici e di medicina preventiva, ed è teoricamente proponibile per un numero limitato di nefriti, come quelle in corso di parassitosi (la malaria per esempio) o quelle da tossici industriali e da farmaci.

L'eradicazione dall'organismo degli antigeni responsabili della formazione di immunocomplessi nefrolesivi è la seconda modalità di intervento terapeutico. Dal momento che il meccanismo di produzione della maggioranza delle

glomerulonefriti è assai complesso e l'antigene responsabile il più delle volte non è noto o comunque non è eliminabile dall'organismo viene ipotizzato il tentativo terapeutico di indurre una "tolleranza" nei confronti dell'antigene stesso. Tramite questo processo, infatti, l'antigene esogeno "tollerato" viene riconosciuto dall'organismo come proprio, non evocando quindi una risposta anticorporea e non inducendo la formazione di immunocomplessi.

Tale evento ancora non è completamente attuabile, ma è noto che la ciclofosfamide è in grado di esplicare un'azione in tal senso.

La terza modalità di intervento terapeutico, la più usata finora, è indirizzata alla modificazione del rapporto antigene-anticorpo che, come abbiamo visto in precedenza, riveste grande importanza nel condizionare la deposizione degli immunocomplessi e, in definitiva, la catena di reazioni infiammatorie che ad essa consegue.

Risultano maggiormente lesivi i complessi in equivalenza stechiometrica fra antigene e anticorpo. Lo spostare tale rapporto verso una situazione di grande eccesso di antigene (immunocomplessi piccoli, filtrati liberamente dal glomerulo, eliminati con le urine e non flogogeni) rappresenta la base concettuale dell'impiego della terapia immunodepressiva nel tentativo di ridurre la risposta anticorporea.

Viene, d'altro canto, postulata anche la possibilità opposta, quella cioè di spostare il rapporto antigene-anticorpo verso una situazione di grande eccesso di anticorpo (immunocomplessi grandi, facilmente smaltibili dal sistema reticolo endoteliale e del mesangio) ottenibile, per esempio, attraverso il blocco selettivo dei linfociti T-suppressori, ed esaltazione quindi della risposta anticorporea da parte dei linfociti B.

b) Modalità di intervento sui mediatori dell'infiammazione

Sono stati proposti numerosi spunti terapeutici nel tentativo di interferire sull'aspetto infiammatorio delle lesioni glomerulari.

Riveste ad esempio grande interesse teorico il blocco farmacologico della liberazione dell'istamina da parte dei basofili e dei mastociti (tappa determinante

nella deposizione intrarenale degli immunodepositi) con sostanze tipo il *Disodiocromoglicato*.

Il tentativo di ridurre l'intensa attività biologica e infiammatoria del complemento è stato condotto sinora con farmaci anticomplementare dubbia e parziale, e muniti di altre attività farmacologiche non sempre desiderabili, come l'*eparina* e l'*acido ε-aminocaproico*.

I *corticosteroidi*, oltre a costituire al cardine della terapia immunodepressiva, sono in grado di ridurre la liberazione di enzimi proteolitici stabilizzando le membrane lisosomiali dei polimorfonucleati.

L'importanza del ruolo delle piastrine nei processi infiammatori delle glomerulonefriti giustifica l'uso di farmaci che ne inibiscono l'aggregazione, e di conseguenza l'attivazione funzionale, come il *dipiridamolo*, l'*indometacina* e l'*acido acetil-salicilico*.

Da non trascurare nemmeno l'utilità teorica di una terapia *anticoagulante*, specie nelle malattie a lesioni proliferative più gravi.

Oggi è però chiaro che i vari mediatori dell'infiammazione agiscono con modalità che si sovrappongono, si amplificano e si sostituiscono l'una all'altra in un'attività reciproca di stimolo a più livelli. A ciò è quindi imputabile il sostanziale fallimento dei tentativi terapeutici.

DRUGS	ACTION	SIDE EFFECTS
CYCLOSPORINE	Calcineurin inhibitor	Gingival hypertrophy Nephrotoxicity, Hypertension, Dyslipidemia, low glucose tolerance, Hyperuricemia, hypertrichosis follicular hyperplasia
CORTICOSTEROIDS	-Stabilization and inhibition of PMN lysosomes release enzymes altering the GMB permeability -Immunosuppression	low glucose tolerance, hypertension Osteoporosis, salt and water retention peptic ulcer, inhibition of growth
AZATIOPRINA	-Inhibition of PMN migration -Immunosuppression	Mieloinibition Infections Liver disease
CICLOFOSFAMIDE CHLORAMBUCIL	-Inhibition of PMN migration -Immunosuppression	Mieloinibition Infections ,Sterility Cystitis,Alopecia
INDOMETACINA	-Inhibition of PMN-migration -Stabilization of PMN lysosomes release enzymes and inhibition -Inhibition of phagocytosis, prostaglandins, Plt aggregation	Peptic ulcer Mieloinibition
HEPARIN	-Anticoagulant	Bleeding
WARFARIN	-Anticoagulant	Bleeding
RITUXIMAB	-Monoclonal antibody antiCD20	Anaphylactic shock

Tabella 5: Farmaci in uso contro le GNF. Azioni ed effetti collaterali.

1.5.4 – Risultati ottenuti con terapia farmacologica

Come abbiamo già detto le conoscenze attuali in tema di eziopatogenesi delle glomerulonefriti sono ancora scarse. E' dunque ovvio che ogni terapia specifica,

non solo delle glomerulonefriti primitive in generale, ma anche in questa o in quella varietà nosologica di esse, costituisca ancora oggi un tentativo di terapia causale, la cui validità su un gruppo più o meno ampio di pazienti è difficilmente valutabile. Tale difficoltà è aggravata dal fatto che i due sintomi clinici sui quali è possibile basare il giudizio di efficacia, l'entità della proteinuria e la rapidità di evoluzione verso l'insufficienza funzionale renale, sono entrambi infidi.

L'entità della proteinuria, infatti, è passibile di modificazioni nel tempo indipendenti da qualsiasi intervento terapeutico, per cui potrebbe risultare ingannevole riferire alla terapia un effetto che non le è proprio.

Anche la rapidità di evoluzione spontanea verso l'IRC è molto variabile, anche nell'ambito di ciascun tipo di glomerulonefrite.

Il giudizio di validità di un qualsiasi schema terapeutico, che si presume agisca a lungo termine rallentando la progressiva distruzione della popolazione nefronica, non è quindi agevole.

Sulla base, però, di numerosi studi clinici condotti nel tempo, si è arrivati a dare una serie di giudizi conclusivi:

- a) l'uso dei cortisonici, eventualmente associati a ciclofosfamide, è giustificato ed opportuno nelle glomerulonefriti a lesioni minime, nella glomerulosclerosi focale segmentale e in quella membranosa [122];
- b) l'uso di indometacina è giustificato, in assenza di grave deficit filtratorio, in tutte le glomerulonefriti con importante proteinuria selettiva (GNF membranosa/membranoproliferativa, forme di glomerulosclerosi focale cortisone- e ciclofosfamide-resistenti) con lo scopo di ridurre l'entità della perdita proteica urinaria;
- c) l'uso di un cocktail di farmaci comprendente un cortisonico, un immunodepressore (azatrioprina o ciclofosfamide), un anticoagulante (eparina), ed un antiaggregante piastrinico (dipiridamolo) può essere giustificato come terapia ultima nelle glomerulonefriti proliferative extra capillari ad insorgenza acuta e rapida evoluzione verso l'uremia [122].

Tutte le ulteriori estensioni dell'indicazione terapeutica di questi farmaci risultano non sufficientemente giustificabili, in considerazione della sicura elevata tossicità dei farmaci in questione, a fronte di una efficacia che appare assai dubbia. E'

meglio rassegnarsi all'impotenza terapeutica piuttosto che rischiare di nuocere. Non dobbiamo infatti dimenticare che la prognosi a lungo termine in questi pazienti, anche nel caso di un'evoluzione verso l'uremia, è oggi favorevolmente modificata "quod vitam" dal trattamento emodialitico [122].

1.6 - MODERNE CONSIDERAZIONI SULL'ETIOPATOGENESI DELLE GNF

Alla luce di queste premesse e nonostante i moderni tentativi di utilizzare nuovi farmaci con risultati non sempre univoci, sulla base di un quadro anatomopatologico, considerando anche la potenziale tossicità dei farmaci e i vari effetti collaterali, ci sembra possibile affermare che, in definitiva, le glomerulonefriti rappresentano diversi aspetti anatomopatologici di un disturbo renale che si presenta con manifestazioni cliniche sostanzialmente accomunabili (ematuria, proteinuria, sindrome nefritica, sindrome nefrosica, etc.). Pertanto i diversi quadri anatomopatologici rappresenterebbero, a nostro avviso, diversi momenti del danno glomerulare, in relazione all'agente eziologico, alla gravità dell'insulto ed alla sua progressione, in rapporto allo stato immunitario del soggetto.

Pertanto, possiamo ribadire che il danno anatomico e le manifestazioni cliniche si determinano in seguito ad un insulto (antigene) noto o sconosciuto, in relazione a fattori genetici predisponenti ed in risposta alle difese messe in atto dal sistema immunitario.

Studi sperimentali hanno, infatti, suggerito, in pazienti con Sindrome Nefrosica da Glomerulonefriti a lesioni minime alcune importanti considerazioni sui meccanismi patogenetici:

- Fattori plasmatici inibenti la blastogenesi indotta dalla fitoemoagglutinina (FEA);
- I linfociti stimolati con FEA e con canavallina A liberano una linfocina che aumenta nelle cavie la permeabilità dei vasi dermici;
- I linfociti hanno effetti tossici sugli endoteli renali.

Tutto ciò porta alla stimolante ipotesi che ai linfociti spetti un ruolo nella determinazione del danno (permeabilizzazione) della membrana basale del glomerulo.

La tendenza della Sindrome Nefrosica a comparire e a recidivare dopo infezioni virali e diatesi allergica, l'associazione con antigeni leucocitari umani (HLA) e la risposta terapeutica a cortisone ed immunosoppressori, supportano l'ipotesi di un possibile ruolo immunologico nella sua patogenesi.

Il danno anatomico e le manifestazioni cliniche si determinano in seguito ad un insulto (antigene) noto o sconosciuto, in relazione a fattori genetici ed in risposta alle difese messe in atto dal sistema immunitario. Già dal 1974 nella genesi della sindrome nefrosica sono stati implicati meccanismi immunomediati dai linfociti:

- Cellule T del sangue periferico di soggetti nefrosici (minimal change, GSFS e nefropatia membranosa idiopatica) riconoscono antigeni renali, come dimostrato dalle risposte delle citochine.
- L'incubazione combinata di monociti con glomeruli isolati di ratto in vitro evidenzia l'incorporazione di solfato nelle glicoproteine glomerulari, come riprova dell'aumentata formazione di matrice extracellulare.
- Nei pazienti con sindrome nefrosica acuta sono stati dimostrati elevati livelli circolanti di IL-2 di catene α del recettore solubile dell'IL-2 e di cellule positive per CD25.
- E' stata dimostrata in campioni di biopsie renali di soggetti con sindrome nefrosica idiopatica, indipendentemente dalla lesione istologica, la presenza di RNA messaggero α del recettore dell'IL2.

Alcuni studi dimostrano che nelle GN si ha una modificazione dell'immunità cellulare da potersi correlare con la patogenesi della malattia. Tale alterazione dell'immunità cellulomediata nella Glomerulonefrite a lesioni minime è dimostrata dall'aumento, in corso di recidiva, nel siero e nelle urine di livelli di neopterina (prodotta dalle cellule T attivate).

Le cellule T di pazienti con sindrome nefrosica dell'infanzia mostrano una alterazione dell'espressione genotipica del gene V, con evidenza di espansione clonale. I linfociti causano in questi soggetti una diminuzione del contenuto di eparin-solfato nei glomeruli immessi in un sistema di coltura in vitro.

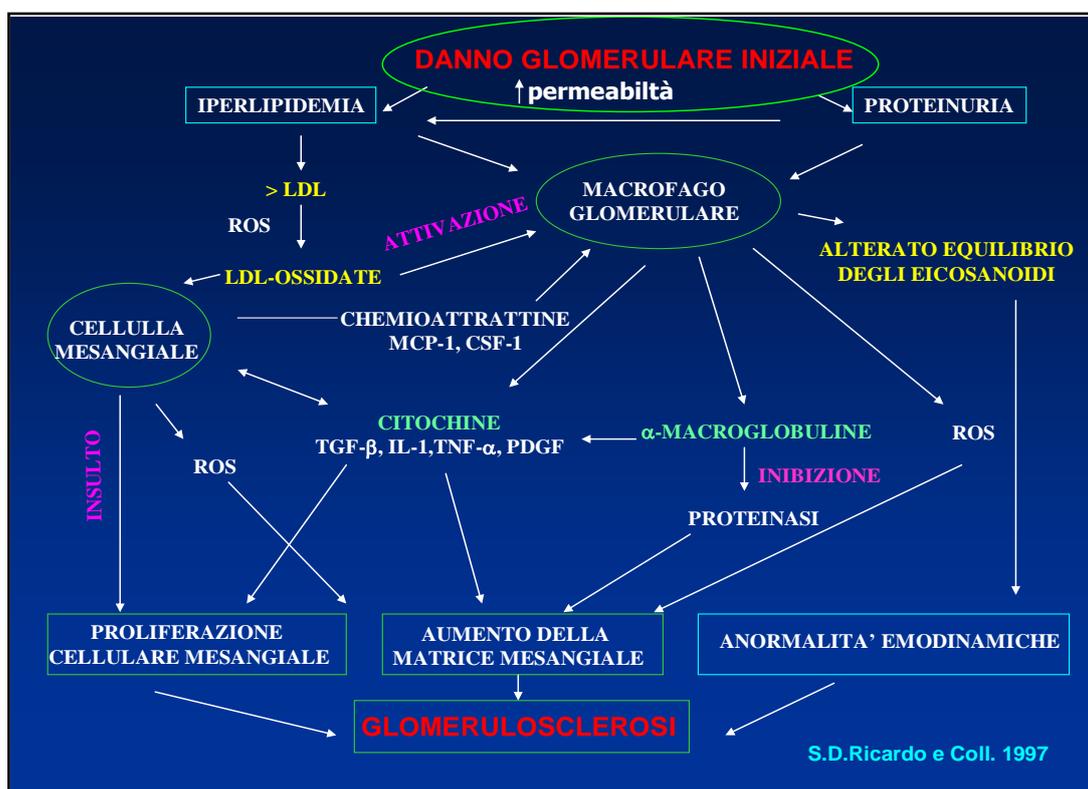
Colture di cellule T di pazienti con Glomerulonefrite a lesioni minime liberano in vitro un fattore di permeabilità vascolare che può essere inibito dal TGF- β 1.

Si può ipotizzare la liberazione patologica di uno o più fattori dai linfociti T CD8+, che poi alterino verosimilmente le caratteristiche strutturali e biochimiche della membrana basale glomerulare, favorendo il transito di proteine.

Ipotetici fattori di permeabilità sono stati descritti anche in corso di Glomerulosclerosi Focale e Segmentale. Non vi sono prove dirette che nella patogenesi delle glomerulonefriti siano implicati meccanismi immunologici e cellulari. Si è però osservato i linfociti di alcuni pazienti con Glomerulonefrite acuta possono essere stimolati da antigeni streptococcici a produrre un fattore inibente i macrofagi.

La patogenesi della GSFS primitiva è sconosciuta. L'aumentata permeabilità dei capillari glomerulari è correlata alla produzione di linfocine proinfiammatorie prodotte dai linfociti T CD4+; non riuscire ad eliminare adeguatamente queste cellule può essere causa di recidive.

Il meccanismo viene attivato dopo l'insulto a livello renale, dove la produzione di chemioattrattine, citochine, fattori di adesione etc. da parte dei macrofagi glomerulari determina la chemiotassi delle cellule mononucleate, con risultato finale di un'infiltrazione renale ed amplificazione della risposta immunitaria.



XXIX

Figura 2: Schema dei meccanismi del danno glomerulare

2 - LA FOTOFERESI

2.1 – CONCETTI GENERALI

La Fotochemioterapia Extracorporea (ECP) è una nuova forma di immunoterapia che consiste nell'utilizzo di un'apparecchiatura per leucoaferesi e che permette l'esposizione extracorporea di leucociti, potenzialmente patogeni, all'8-metossipsoralene (8-MOP) e alle radiazioni ultraviolette, cui segue la reinfusione delle cellule così trattate.

La ECP può rappresentare una nuova e promettente possibilità terapeutica per il trattamento delle malattie autoimmuni.

La fotoferesi è una terapia immunomodulatoria approvata dalla United States Food and Drug Administration sin dal 1988 per il trattamento delle forme avanzate di linfoma cutaneo a cellule T (CTCL).

Tale metodica è attualmente presente in oltre 150 centri terapeutici in tutto il mondo e rappresenta l'indicazione di prima scelta per alcune forme leucemiche di CTCL, come la sindrome di Sezary, caratterizzata eritrodermia, cellule T neoplastiche periferiche e linfadenopatia.

La fotoferesi è una particolare leucoaferesi che irradia attraverso i raggi UVA i leucociti prodotti e miscelati ad un farmaco alchilante (8-MOP).

2.2 – ASPETTI TECNICI

Brevemente diciamo che dal punto di vista tecnico la ECP nasce con il sistema UVAR Therakos, costituito da un separatore cellulare a flusso discontinuo, singolo accesso vascolare, con campana di Lathan 125 ml e da un sistema di fotoattivazione UVA con emissione controllata di radiazione di lunghezza d'onda compresa tra i 320-370nm. Il frazionamento ematico avviene per centrifugazione. La procedura si articola in sei fasi di prelievo, ad ogni ciclo vengono frazionati 40ml di buffy coat, miscelati a plasma soluzione fisiologica eparinata e 8MOP, sospinti da una pompa peristaltica nella camera di fotoattivazione in forma di film unicellulare (0,1 mm di spessore) esposta alla radiazione UVA con un'intensità di

2J-cm² per un tempo pari a tre ore. Al termine la sospensione viene reinfusa al paziente.

Lo schema generalmente applicato nella terapia del CTCL prevede due sedute consecutive di ECP con un intervallo libero di quattro settimane per un periodo minimo di sei mesi.

Si utilizza la forma liquida della molecola 8MOP (8 metossi-psoralene), 5 ml pari a 100000 ng di 8MOP, iniettati direttamente nella sacca di raccolta del buffy coat all'atto dell'installazione della linea extracorporea.

Ad ogni procedura è indispensabile la valutazione qualitativa della sospensione cellulare ottenuta considerando l'ematocrito e la purezza della raccolta di cellule mononucleate. Per il corretto irraggiamento UVA dei linfociti frazionati è necessario che l'inquinamento eritrocitario sia minimo (<3%); i globuli rossi presenti nel film unicellulare hanno un'azione di scudo all'irraggiamento UVA.

Dal punto di vista tecnico-afereico UVAR Therakos è un sistema dedicato, chiuso, manuale, il separatore cellulare non ha l'efficienza e purezza nel frazionamento presente nelle apparecchiature di ultima generazione.

Esistono apparecchiature alternative al sistema UVAR che utilizzano un separatore cellulare Spectra-Cobe BCT per la leucoaferesi ed eseguono la fotoattivazione con il sistema UVAR Therakos.

Altro sistema è l'associazione del separatore cellulare Spectra a un sistema di fotoirradiazione UV.

2.3 – MECCANISMO D'AZIONE

Il reale meccanismo d'azione della fotochemioterapia extracorporea (ECP) non è ancora completamente conosciuto; un ruolo centrale è sicuramente svolto dalla fotoattivazione UVA dell'8-methoxypsoralene (8-MOP), e conseguente reazione fotochimica con componenti intracellulari dei linfociti [123].

Sia l'8 MOP che gli UVA da soli sono in grado di reagire con diverse macromolecole del compartimento intracellulare, ma insieme essi possono implementare un ampio spettro di effetti biologici: reazioni chimiche covalenti, non covalenti e ossidative a carico del DNA, dell'RNA, delle proteine e delle membrane cellulari (vedi Tabella 6).

- Induzione dell'apoptosi delle cellule T attraverso l'alchilazione del DNA con formazione di fotoaddotti, blocco della replicazione e della trascrizione
- Altri bersagli dell'8-MOP sono il centromero (cmDNA), le proteine citoplasmatiche, il lisozima, l'albumina, la ribonucleasi, la DNA-polimerasi, i lipidi e gli aminoacidi quali tiroxina, triptofano, fenilalanina
- Attivazione delle cellule dendritiche e dei macrofagi con conseguente amplificazione del processo apoptotico e rilascio di antigeni e mediatori proinfiammatori
- Induzione di un'immunità anticlonale

Tabella 6: Potenziali meccanismi d'azione della fotoferesi

L'8-MOP diffonde rapidamente nel nucleo cellulare e dopo esposizione UVA si lega covalentemente con il DNA provocando un arresto proliferativo e induzione dell'apoptosi entro 48h dalla procedura fotoferetica (vedi figura 3).

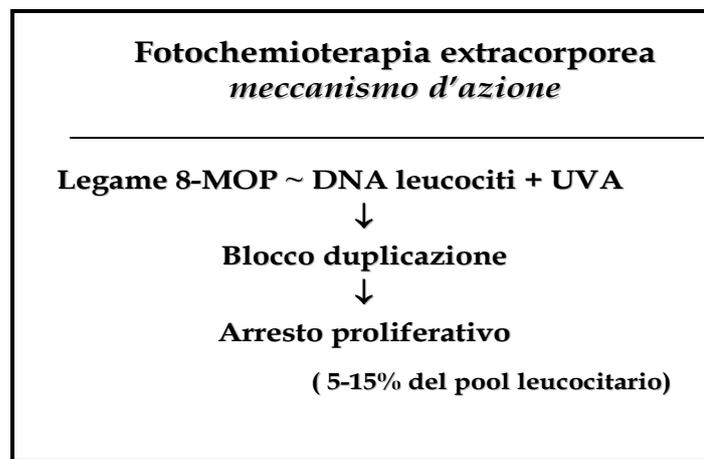


Figura 3: Meccanismo d'azione dell'ECP

Sebbene un'elevata percentuale di cellule T trattate vada incontro ad apoptosi dopo esposizione a 50 ng/ml di 8-MOP e a 2 J/cm² di UVA, i macrofagi del sangue periferico sembrano presentare comparativamente alle cellule T una resistenza all'effetto apoptotico. Infatti, successivamente al completamento della procedura, i monociti trattati presentano un'attivazione fenotipica con aumentata espressione

di citochine pro-infiammatorie, molecole di adesione e complessi maggiori di istocompatibilità essenziali per la presentazione dell'antigene (vedi fig. 4).



Figura 4: Meccanismo d'azione dell'ECP

Studi di citometria a flusso hanno dimostrato che successivamente al trattamento di fotochemioterapia extracorporea (ECP) è presente un up-regulation di molecole accessorie (CD86) e di adesione (CD36) sulla superficie di membrana dei macrofagi. Questi dati sono di rilevante importanza nell'indurre e amplificare la fagocitosi delle cellule apoptotiche, la processazione degli antigeni dei cloni cellulari patologici, e nell'induzione di un'immunità anticlonotipica. L'evidenza che la fotoferesi induca una immunità anticlonotipica è stata suggerita attraverso numerosi esperimenti effettuati su modelli animali; a questo riguardo uno studio condotto su modello murino di encefalite allergica si è rivelato particolarmente utile: l'induzione dell'encefalite dopo inoculazione di proteina mielinica basica è associata ad una distruzione del sistema nervoso centrale mediata dalle cellule T; tali cellule possono essere isolate e clonate in vivo. Quando le cellule patogene vengono inoculate in ratti sani questi sviluppano la patologia. Se il clone patogeno viene prima trattato con 8-MOP e UVA e poi infuso negli animali, questi non sviluppano la malattia.

La protezione dall'insorgenza dell'encefalite sembra essere mediata dalla generazione di linfociti T-suppressor clone specifici.

In altre parole la ECP è un mezzo terapeutico utile allo sviluppo di una immunomodulazione extracorporea sostenuta da linfociti citotossici CD8+ clone specifici. I linfociti T, bersaglio della ECP, sono modificati dall'evento di fotoattivazione (8MOP + UVA) e sviluppano una spiccata immunogenicità in assenza di soppressione della risposta immune dell'ospite.

Un interessante studio, condotto da Blandon e Taylor, sembra supportare l'ipotesi che la ECP possa ridurre il numero di monociti nel sangue periferico (PBMC) che producono citochine pro-infiammatorie [126].

L'ipotesi dello studio era quella di una forma di apoptosi precoce, che iniziasse già a livello della "buffy coat bag" e che coinvolgesse meccanismi differenti da quelli responsabili dell'apoptosi che si verificava successivamente dopo la reinfusione.

Lo scopo dello studio era quello di stabilire l'immediata influenza della ECP sulla secrezione delle citochine pro-infiammatorie.

Campioni di crema leucocitaria erano prelevati da 11 pazienti (6 CTCL, 5 GVHD), sottoposti a ECP, prima e dopo la fotoattivazione e prima della reinfusione,.

Sia nella CTCL che nel GVHD era presente un aumento dei livelli di TNF- α , IFN γ e IL-6, queste citochine giocano un ruolo importante nel meccanismo patogenetico di tali patologie. Attraverso un'analisi di citometria a flusso venivano testati i livelli di IFN γ secreto dalle cellule T e TNF- α secreto dalle cellule T e dai monociti. Le PBMC trattate con ECP mostravano avere una soppressione di TNF- α , IFN γ e IL-6, l'esecuzione della Northern blot rilevava una down-regulation dell'mRNA codificante per queste due citochine in entrambi i gruppi dei pazienti trattati, con notevole beneficio clinico; al contrario i monociti non trattati presentavano una amplificata trascrizione dei geni per il TNF- α , l'IL-6 e IFN γ . In seguito ad ECP i linfociti non solo mostravano segni di apoptosi ma era anche presente un'incrementata espressione di MHC-I, contemporaneamente i monociti presentavano una rapida conversione fenotipica verso le cellule dendritiche (vedi figura 5) con aumentata avidità fagocitica verso le cellule Th2 apoptotiche, processo che comporta la processazione e l'esposizione dell'antigene ai linfociti T CD8+ con conseguente immunità anticlonotipica in grado di reagire anche nei confronti delle cellule non trattate dalla ECP, con uno shift delle citochine Th2 verso le citochine Th1 (vedi figura 6).

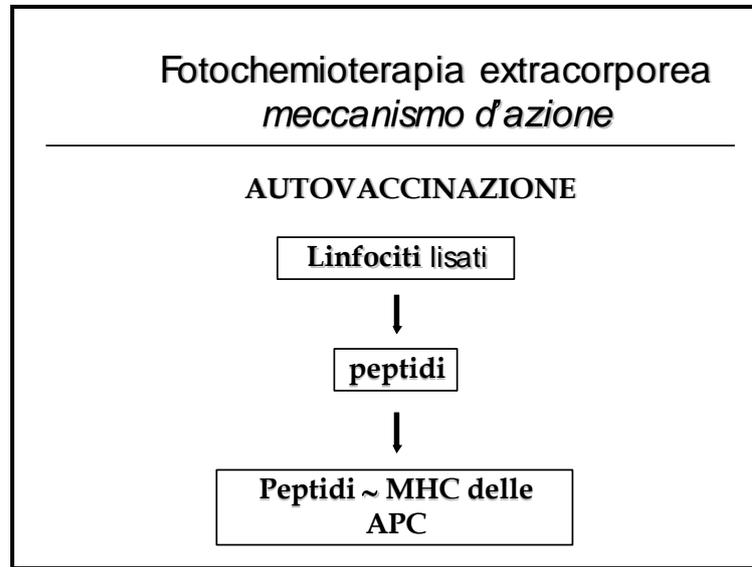


Figura 5: Meccanismo d'azione dell'ECP

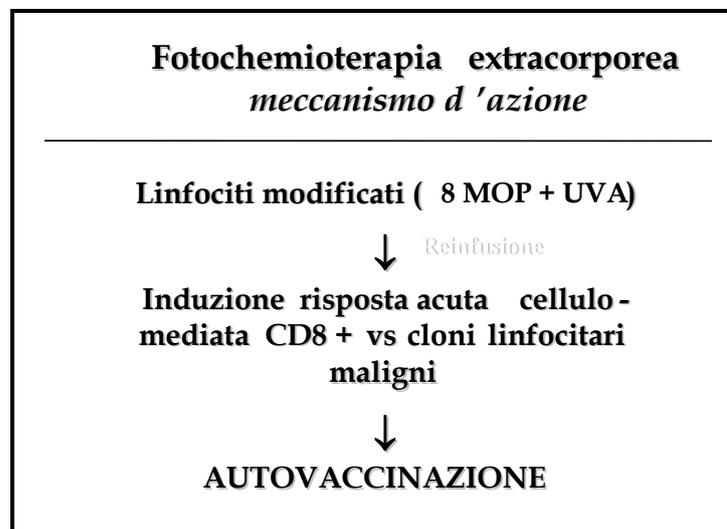


Figura 6: Meccanismo d'azione dell'ECP

Numerosi studi prima di questo avevano notato la riduzione dei livelli di tali citochine dopo la reinfusione sia in vivo con il dosaggio ematico, sia in vitro, ma questo, per primo ha evidenziato che sia l'apoptosi che lo sviluppo dell'immunità

anticlonotipica inizia a livello della buffy coat bag. A tale proposito numerose ipotesi sono state prese in considerazione [126].

I linfociti trattati durante ECP costituiscono circa il 10% della popolazione linfocitaria, quindi insufficienti per giustificare una immunogenicità indotta (autovaccinazione). Probabilmente la temperatura subfisiologica del sistema (29 gradi), la pompa peristaltica, il ricircolo, il bagno di citochine rilasciate dai monociti presenti nella sospensione, le modificazioni indotte nella espressività degli antigeni del complesso MHC-I determinano verosimilmente una rottura della immunotolleranza dalla proliferazione clonale delle cellule neoplastiche, ed uno stimolo all'attività cellulare citotossica CD8+ verso il clone cellulare proliferante.

Di grande interesse scientifico si sono dimostrati essere anche gli studi condotti allo scopo di comprendere i possibili meccanismi coinvolti nel processo di apoptosi indotta dalla ECP.

La morte cellulare come conseguenza dell'apoptosi differisce nettamente dalla necrosi. Inizialmente descritta come un processo di suicidio per mantenere l'omeostasi tissutale, essa è essenzialmente un meccanismo di difesa contro l'oncogenesi.

Numerosi geni sono implicati nella regolazione dell'apoptosi: il gene oncosoppressore codificante per la proteina p53 regola duplicazione cellulare intervenendo nella fase G1/S della mitosi. La proteina p53 interviene quando è presente DNA danneggiato, arrestando il ciclo cellulare, permettendo la riparazione del DNA o favorendo l'apoptosi. In questo modo tale proteina agisce mantenendo l'integrità del genoma, prevenendo la mutagenesi e lo sviluppo di cloni neoplastici.

Bcl-2 e Bax sono due geni ampiamente studiati che sembrano influenzare la sopravvivenza di molti tipi cellulari, incluse la cellule del sistema emopoietico. Le proteine prodotte da questi due geni sono in grado di creare un eterodimeri tra loro; un eccesso di etrodimero Bcl2/Bax inibisce l'apoptosi, mentre l'omodimero Bax-Bax amplifica il processo apoptotico. Un incremento dei livelli di p53 sono stati osservati dopo esposizione di DNA danneggiato a luce ultravioletta, ma non ne è stato rilevato alcun incremento dopo trattamento ECP.

Bcl-2 esercita il suo effetto antiapoptosico attraverso numerosi processi che includono un effetto antiossidante, mantenimento del potenziale elettrico della membrana mitocondriale e blocco della corrente del calcio attraverso la membrana citoplasmatica.

Bax al contrario promuove l'apoptosi inducendo il rilascio del citocromo c dei mitocondri provocando l'arresto del ciclo respiratorio. È stato dimostrato che immediatamente dopo ECP vi è una diminuzione del rapporto Bcl-2/Bax nei linfociti testati ($p < 0.005$). Questa apoptosi precoce, come Blandon e Taylor hanno notato, deriva dallo stress ossidativo delle membrane cellulari e mitocondriali favorito dal microambiente e dalla reazione fotochimica che favoriscono una disregolazione di Bcl-2 e Bax, mentre non sembrano influenzare l'attività di p53 [127].

2.4 – EFFETTI COLLATERALI

Le esperienze riportate in letteratura sin dal 1985 dimostrano che il trattamento fotoforetico è generalmente ben tollerato. Il più comune effetto collaterale, legato all'assunzione orale dello psoralene, è la nausea. Questo sintomo è generalmente di breve durata (30-60 min) e talvolta può essere associato a vomito. Recentemente la FDA ha approvato la somministrazione dello psoralene direttamente nella buffy coat bag, permettendo di eliminare completamente la variabile di quota 8MOP assorbita a livello gastroenterico ed eliminando ogni effetto collaterale legato all'assunzione per os del farmaco.

L'ipotensione si può verificare durante la fase leucoferetica in particolare in pazienti che assumono farmaci antiipertensivi e/o diuretici. Questa complicanza è spesso superabile attraverso la somministrazione di soluzione salina anche nei pazienti cardiopatici.

Una febbre può comparire durante le successive 4-12 h dal trattamento, essa generalmente è asintomatica e non richiede la somministrazione di farmaci antipiretici. È comunque importante considerare che la fotoforesi è frequentemente applicata in pazienti immunodepressi, è quindi buona norma eseguire sempre un esame emoculturale al picco febbrile.

Sebbene anche i leucociti normali sono esposti al trattamento, una diminuzione di questi elementi non è stata osservata nei controlli effettuati su sangue periferico. Questo suggerisce che la fototerapia, a confronto con i farmaci immunodepressivi e chemioterapici, produca minori effetti collaterali e possa apportare dei benefici terapeutici non gravati dalla depressione della risposta immune.

La sicurezza della procedura è dimostrata dal numero totale di trattamenti eseguiti con il sistema UVAR Therakos (8195 nel 1995) in 35 centri operanti in Europa.

Analizzando globalmente l'attività dei centri operanti in Europa emerge un ulteriore dato significativo: la terapia fototerapica viene applicata sempre più frequentemente in pazienti a stadi iniziali di malattia oltre che, come generalmente descritto, in pazienti in stadio avanzato.

Il trattamento agli stadi precoci di malattia consente di interagire più efficacemente con un network immunitario competente (popolazione CD8+ >150mmc).

2.5 - INDICAZIONI CLINICHE

Numerosi trial clinici hanno dimostrato l'efficacia di questa terapia nel trattamento di forme avanzate di linfomi cutanei a cellule T, dimostrando un significativo allungamento della vita dei pazienti che ne sono affetti.

Ultimamente alcuni studi affermano che la ECP possa modificare la risposta immunitaria contro gli organi trapiantati, riducendo le manifestazioni di rigetto, con un risultato simile a quello raggiunto con alti dosaggi di farmaci immunosoppressori ed immunomodulatori.

Nella tabella 7 sono riportate le applicazioni cliniche attualmente codificate secondo le FDA.

-
- Forme avanzate di linfoma cutaneo a cellule T ,approvato dalla FDA. (CTCL, Micosi Fungoide, S. di Sezary)
 - Graft versus host disease
 - Rigetto di trapianto (Cuore, Polmone, Rene)
 - Artrite Reumatoide
 - Pemfigo bolloso
 - Lupus sistemico eritematoso
 - Sclerosi sistemica
-

Tabella 7: Applicazioni cliniche convalidate dell'ECP

CTCL: è una patologia caratterizzata dalla presenza di cloni maligni di cellule T (linfociti T CD4+).

I segni iniziali di questa patologia sono spesso caratterizzati dalla presenza di placche e noduli cutanei, eritrodermia e talvolta linfadenopatia e linfociti T maligni al sangue periferico.

Con il progredire della patologia il coinvolgimento sistemico diviene sempre più evidente.

Sebbene protocolli terapeutici con polichemioterapia siano stati raccomandati dalla FDA, le forme avanzate di CTCL non sembrano migliorare la prognosi di questi pazienti.

I primi trial multicentrici condotti da Edelson et al sull'utilizzo della ECP nei avanzati di CTCL, e successivamente quelli condotti da Gottlieb et al, Sausville et al, Lessin et al hanno dimostrato un decremento del numero delle cellule T CD4+ nel sangue periferico in tutti i pazienti che ricevevano trattamento con ECP per un periodo minimo di due fino a sei mesi. I follow-up eseguiti mostravano un notevole miglioramento delle condizioni cliniche e aumento della sopravvivenza di circa 30-40 mesi superiore ai gruppi di controllo dei pazienti che non ricevevano ECP.

Graft versus host disease: Circa il 30-50% dei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo (BMT) sviluppa GVHD. L'organo trapiantato sviluppa una risposta immune verso gli antigeni tissutali dell'ospite, in particolare nei confronti di organi quali la pelle, i polmoni, il fegato e il tratto gastrointestinale.

Il GVHD può essere acuto (quando compare entro 100 giorni dal trapianto) o cronico (quando compare dopo i 100 giorni). La sepsi, l'insufficienza epatica e respiratoria rappresentano le principali cause di morte in questi pazienti.

Le terapie immunosoppressive (steroidi, ciclosporina A, tacrolimus, azathioprina e l'infusione di immunoglobuline) utilizzate nel trattamento del GVHD possono facilitare l'insorgenza di stati settici e provocare complicanze quali insufficienza renale, neuropatia e tumori.

L'avvento della ECP ha permesso in numerosi casi di ridurre la posologia di questi farmaci e quindi le complicanze legate al loro utilizzo.

Tra i più recenti e convincenti dati riportati in letteratura (Dall'Amico et al, e Greinix et al) si evince la necessità di attuare prima possibile trials clinici che dimostrino in maniera inequivocabile l'utilità di questa terapia nel periodo post trapianto.

3 - SCOPO DELLO STUDIO

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'efficacia terapeutica e la "safety" della fotochemioterapia extracorporea (ECP) nelle nefropatie glomerulari resistenti/dipendenti agli usuali schemi terapeutici immunosoppressori.

Infatti, quanto precedentemente detto ci porta ad ipotizzare un comune denominatore nell'eziopatogenesi delle glomerulonefriti, ovvero un unico meccanismo immunologico alla base dei diversi quadri istopatologici. L'aspetto morfologico infatti rappresenterebbe solo l'evoluzione di un danno sempre secondario ad un'attivazione del sistema immune.

Alla luce di quanto detto, pertanto, si ritiene che la fotoferesi possa agire sulla disregolazione immunologica grazie alla sua azione immunomodulante.

4 – MATERIALI E METODI

Sono stati arruolati sei pazienti, 5 maschi e 4 femmine, di età media di 32.7 ± 8.9 anni, affetti da sindrome nefrosica con funzione renale > 60 ml/min, tranne che in due soggetti. La diagnosi istologica biotticamente accertata era di Glomerulosclerosi Focale Segmentale in 6 pazienti. Per gli altri tre soggetti, invece, si trattava di Glomerulonefrite Membranosa tipo I, Glomerulonefrite membrano-proliferativa e Glomerulonefrite Lupica in classe III. In tutti i pazienti è stata valutata la creatininemia, la clearance della creatinina con la formula CKD-EPI, la proteinuria delle 24 ore, l'elettroforesi delle proteine urinarie, l'azotemia, l'uricemia, gli elettroliti e la crasi ematica. L'eventuale progressione del danno renale è stata prospettata anche dalla valutazione del rapporto proteinuria/creatinuria su un campione di urine del mattino.

E' stata inoltre effettuata una valutazione immunologica e dell'attività infiammatoria attraverso la Proteina C Reattiva, il fibrinogeno, la VES, il C3, il C4 e le immunoglobuline.

Il follow up medio è stato di 41.3 ± 21.7 mesi (min 6m/max 66m). Da segnalare che nel corso del follow up un soggetto è uscito dal protocollo per raggiungimento dell'ESRD, dopo tuttavia aver ottenuto oltre 36 mesi di controllo post-trattamento. Tutti i soggetti, i quali non presentavano adeguata risposta alla terapia farmacologia immunosoppressiva o ad altri trattamenti aferetici, sono stati sottoposti a cicli di fotochemioterapia extracorporea secondo il seguente schema: 1 ciclo (2 sedute in 2 giorni consecutivi) ogni 15 giorni per tre mesi, seguiti da 1 ciclo al mese per altri tre mesi.

Il follow-up è stato effettuato ogni 3 mesi nel primo anno e poi ogni 12 mesi.

La pressione arteriosa media è stata periodicamente controllata e mantenuta entro i parametri indicati dalle linee guida internazionali attraverso eventuali adeguamenti terapeutici (PAS $128,69 \pm 8$ mm/Hg; PAD $81,4 \pm 7,6$ mm/Hg).

La proteinuria delle 24h, nel periodo precedente al trattamento andava da un valore minimo di 3,5g/24h a un massimo di 11,5g/24h (media 6.21 ± 2.96 g/24h).

I dati della creatininemia erano compresi tra 0,6 mg/dl e 2,79 mg/dl (media 1,41±0,76 mg/dl).

Il filtrato glomerulare (VFG), calcolato secondo il CKD-EPI, variava tra 21 ml/min e 134 ml/min, con un valore medio di 80,7 ± 36.3 ml/min.

Lo studio dell'assetto lipidico ha mostrato valori di colesterolemia compresi tra 485 mg/dl e 216 mg/dl, per una media pari a 358.75 ± 115.4 mg/dl (tabella 8).

	Pz 1	Pz 2	Pz 3	Pz 4	Pz 5	Pz 6	Pz 7	Pz 8	Pz 9	Media	SD±
Creat. (mg/dl)	1,2	2,79	0,6	1,05	1,7	0,88	2,3	1	1,4	1,44	0,76
BUN (mg/dl)	33	61	15	20	43	22	25	63	35	35,25	18,6
Pr 24h (g/24h)	7,54	3,5	7,5	8,2	11,5	3,68	3,5	4,8	6,3	6,215	2,96
EPI (ml/min)	77,8	21	134	71	76	105,7	48	112	80,8	80,6875	36,26
Col. Tot.(mg/dl)	468	298	485	277	488	216	233	405	360	358,75	115,44

Tabella 8: Valori pre-fotoferesi

5 – RISULTATI

I dati preliminari dopo il trattamento con ECP nel follow-up a 3 mesi hanno mostrato una riduzione media della proteinuria delle 24 ore statisticamente significativa (proteinuria media da $5.98 \pm 2,69$ g/24h a $3.23 \pm 1,53$ g/24h; $p < 0.05$) che è stata confermata nei controlli successivi (tabella 9; figura 7).

	Tempo 0	3 mesi	6 mesi	12 mesi	24 mesi	36 mesi
Pz 1	7,54	3,75	2,6	0,73	0,7	0,5
Pz 2	3,5	1,4	0,3	0,45	0,4	0,3
Pz 3	7,5	4	2,5	0,3	0,3	0,3
Pz 4	8,2	1,5	0,68	0,58	0,6	0,5
Pz 5	11,5	6,2	2,8	0,68	0,7	0,3
Pz 6	3,8	1,8	1,2	0,39	0,3	0,3
Pz 7	3	2,6	2,1	5,4	4	-
Pz 8	4,8	4,8	5,6	2	-	-
Pz 9	4	3	3	2	1,4	1,4
media	5,98	3,23	2,22	1,39	1,05	0,51
SD±	2,69	1,53	1,48	1,54	1,16	0,37

Tabella 9: Andamento della proteinuria delle 24h nel follow up

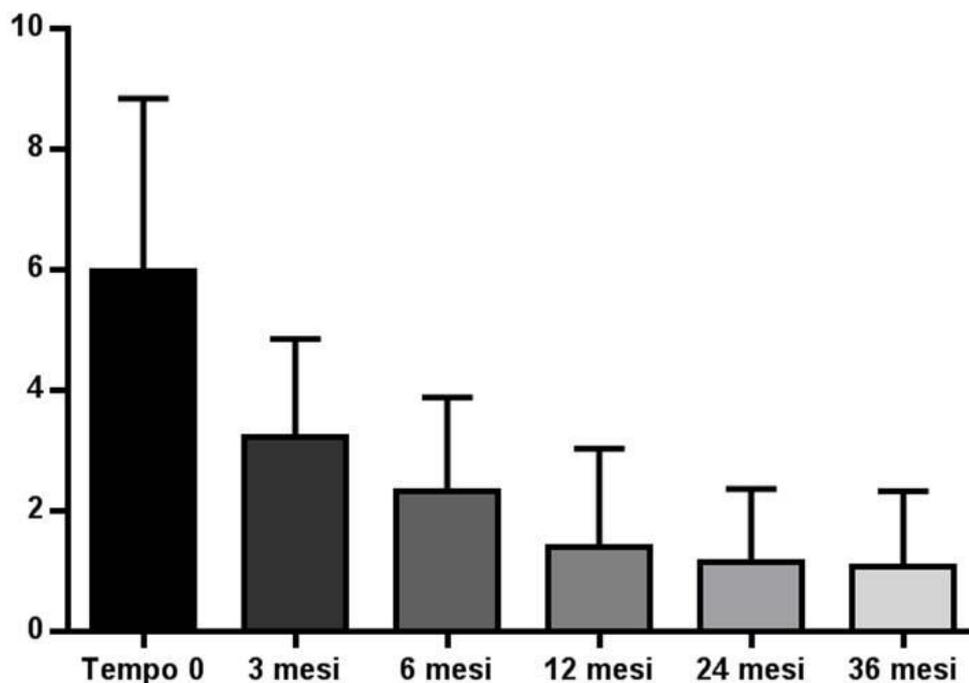


Figura 7: c proteinuria media delle 24h (p 0.038)

La funzione renale nel follow-up ha mostrato, inoltre, un filtrato glomerulare conservato in tutti i pazienti (figura 8), eccetto che in 2 pazienti i quali però presentavano già un filtrato notevolmente ridotto (tanto che un soggetto ha dovuto iniziare la terapia sostitutiva).

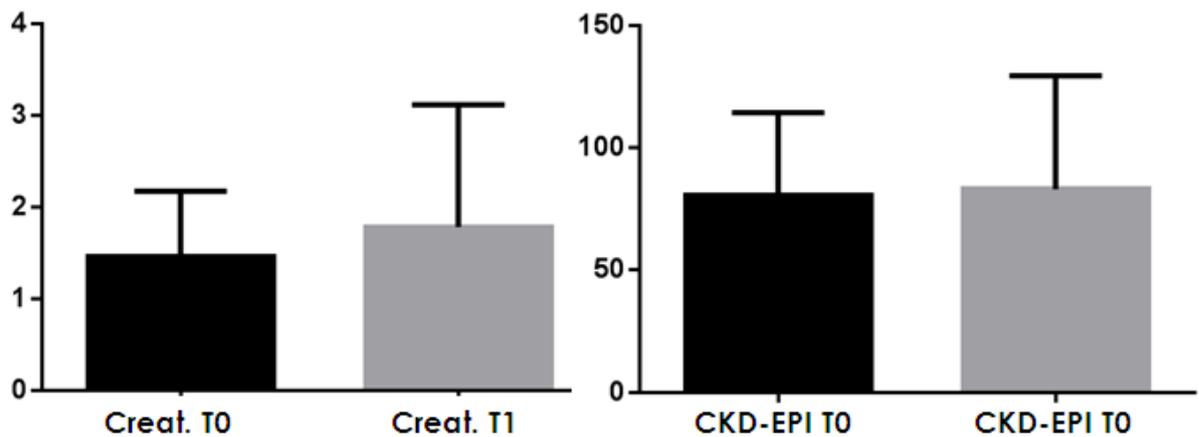


Fig. 8: andamento della funzione renale pre-ECP e al fine del follow up ($p>0.05$)

In accordo con la riduzione della proteinuria si assisteva altresì ad un riequilibrio dell'assetto lipidico con valori di colesterolemia che rientravano nei range di normalità praticamente in tutti i pazienti (figura 8; $p<0.0001$).

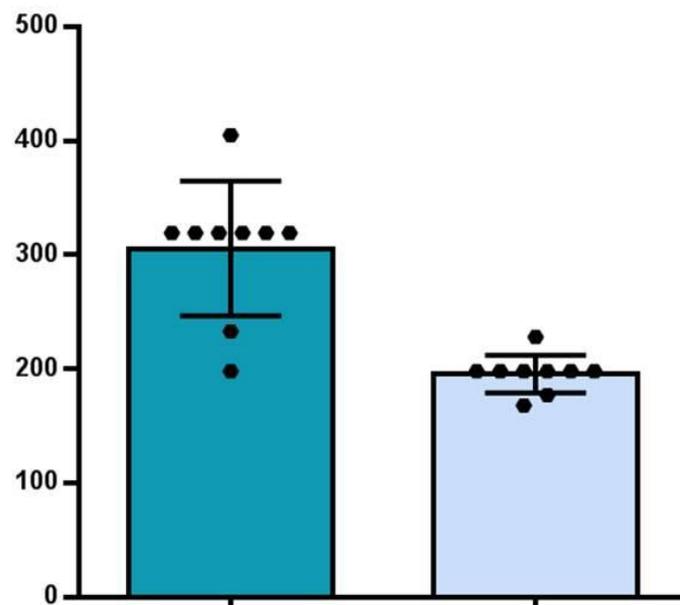


Figura 9: Variazioni dell'assetto lipidico ($p<0.0001$)

6 – DISCUSSIONE

I risultati in nostro possesso, nonostante la scarsa casistica, sono piuttosto incoraggianti per ciò che possa essere l'utilizzo della fotochemioterapia extracorporea nel trattamento delle glomerulonefriti, indipendentemente dal quadro istopatologico.

Le glomerulonefriti sono patologie che, a tutt'oggi, presentano numerosi punti oscuri sulle cause e i meccanismi che portano alla loro insorgenza, ma nelle quali si è ormai assodata l'importanza dei meccanismi immunitari. Tutto questo ha portato, negli anni, allo sviluppo di schemi terapeutici con farmaci ad azione immuno-soppressiva, che hanno dimostrato risultati buoni ma non uniformi e costanti.

C'è inoltre da ricordare come tali farmaci presentino una serie di effetti collaterali per nulla trascurabili, primo tra tutti la riduzione delle difese immunitarie con conseguente esposizione al rischio di infezioni opportunistiche e a tutto un corteo sintomatologico dovuto all'azione degli stessi.

I dati in nostro possesso lasciano quindi prevedere che la ECP svolga un ruolo terapeutico fondamentale nel trattamento delle glomerulonefriti. La proteinuria delle 24 ore ha mostrato una netta riduzione dei suoi valori in tutti e 6 i pazienti; verosimilmente tale dato può non assumere grande rilevanza nei due pazienti che presentavano Insufficienza Renale Cronica prima dell'inizio del trattamento, in quanto tale parametro potrebbe essere conseguenza di una riduzione del filtrato glomerulare renale per sclerosi glomerulare.

Da sottolineare come gli effetti benefici sulla proteinuria non siano limitati al solo periodo di trattamento ma continuino anche nel periodo immediatamente successivo al ciclo di fotoferesi, cosa che invece spesso non si osserva con la terapia farmacologica, determinandosi spesso una riattivazione della malattia con incremento della proteinuria non appena il farmaco viene sospeso. Tutto ciò indubbiamente rappresenta, se verrà confermato anche nei prossimi follow-up, un passo avanti rispetto alla comune terapia immunosoppressiva, e lascia ipotizzare che l'ECP possa realmente avere quell'effetto immunomodulante che porta

“all'autovaccinazione” che in letteratura viene segnalata da più autori. Pertanto questa tecnica può nel tempo diventare una valida alternativa agli attuali protocolli terapeutici, soprattutto in quei pazienti che si dimostrano refrattari e/o poco responsivi alla terapia farmacologica e che sono obbligati a sospenderla.

In accordo con i dati in letteratura, di grande rilevanza risulta essere l'assoluta mancanza di effetti collaterali nei nostri pazienti sottoposti ad ECP.

Per quanto riguarda il reale meccanismo d'azione della fototerapia extracorporea (ECP) questo non è ancora completamente noto; un ruolo centrale è sicuramente svolto dalla fotoattivazione UVA dell'8-methoxypsoralene (8-MOP), e alla conseguente reazione fotochimica con componenti intracellulari dei linfociti [123].

Sia l'8 MOP che gli UVA da soli sono in grado di reagire con diverse macromolecole del compartimento intracellulare, ma insieme essi possono implementare un ampio spettro di effetti biologici quali reazioni chimiche covalenti, non covalenti e ossidative a carico del DNA, dell'RNA, delle proteine e delle membrane cellulari. Tale azione può esplicarsi su:

1. Le **cellule T**.
2. Il **centromero** (cmDNA) , le **proteine citoplasmatiche**, il **lisozima**, l'**albumina**, la **ribonucleasi**, la **DNA-polimerasi**, i lipidi e gli aminoacidi quali tiroxina, triptofano, fenilalanina.
3. Le **cellule dendritiche** e i **macrofagi**.
4. **L'immunità anticlinale**.

L'8-MOP diffonde rapidamente nel nucleo cellulare e dopo esposizione UVA si lega covalentemente con il DNA provocando un arresto proliferativo e induzione dell'apoptosi entro 48h dalla procedura fototerapica.

Sebbene un'elevata percentuale di cellule T trattate vada incontro ad apoptosi dopo esposizione a 50 ng/ml di 8-MOP e a 2 J/cm² di UVA, i macrofagi del sangue periferico sembrano presentare comparativamente alle cellule T una resistenza all'effetto apoptotico. Infatti, successivamente al completamento della procedura, i monociti trattati presentano un'attivazione fenotipica con aumentata espressione di citochine proinfiammatorie, molecole di adesione e complessi maggiori di istocompatibilità essenziali per la presentazione dell'antigene.

Studi di citometria a flusso hanno dimostrato che successivamente al trattamento di fotochemioterapia extracorporea (ECP) è presente un up-regulation di molecole accessorie (CD86) e di adesione (CD36) sulla superficie di membrana dei macrofagi. Questi dati sono di rilevante importanza nell'indurre e amplificare la fagocitosi delle cellule apoptotiche, la processazione degli antigeni dei cloni cellulari patologici, e nell'induzione di un'immunità anticlonotipica. L'evidenza che la fotoferesi induca una immunità anticlonotipica è stata suggerita attraverso numerosi esperimenti effettuati su modelli animali; a questo riguardo uno studio condotto su modello murino di encefalite allergica si è rivelato particolarmente utile: l'induzione dell'encefalite dopo inoculazione di proteina mielinica basica è associata ad una distruzione del sistema nervoso centrale mediata dalle cellule T; tali cellule possono essere isolate e clonate in vivo. Quando le cellule patogene vengono inoculate in ratti sani questi sviluppano la patologia. Se il clone patogeno viene prima trattato con 8-MOP e UVA e poi infuso negli animali, questi non sviluppano la malattia.

La protezione dall'insorgenza dell'encefalite sembra essere mediata dalla generazione di linfociti T-suppressor clone specifici.

In altre parole la ECP è un mezzo terapeutico utile allo sviluppo di una immunomodulazione extracorporea sostenuta da linfociti citotossici CD8+ clone specifici. I linfociti T, bersaglio della ECP, sono modificati dall'evento di fotoattivazione (8MOP + UVA) e sviluppano una spiccata immunogenicità in assenza di soppressione della risposta immune dell'ospite.

Un interessante studio, condotto da Blandon e Taylor, sembra supportare l'ipotesi che la ECP possa ridurre il numero di monociti nel sangue periferico (PBMC) che producono citochine proinfiammatorie [126].

L'ipotesi dello studio era quella di una forma di apoptosi precoce, che iniziasse già a livello della "buffy coat bag" e che coinvolgesse meccanismi differenti da quelli responsabili dell'apoptosi che si verificava successivamente dopo la reinfusione.

Lo scopo dello studio era quello di stabilire l'immediata influenza della ECP sulla secrezione delle citochine pro-infiammatorie.

Campioni di crema leucocitaria erano prelevati da 11 pazienti (6 CTCL, 5 GVHD), sottoposti a ECP, prima e dopo la fotoattivazione e prima della reinfusione.

Sia nella CTCL che nel GVHD era presente un aumento dei livelli di TNF α , IFN γ e IL-6, queste citochine giocano un ruolo importante nel meccanismo patogenetico di tali patologie. Attraverso un'analisi di citometria a flusso venivano testati i livelli di IFN γ secreto dalle cellule T e TNF α secreto dalle cellule T e dai monociti. Le PBMC trattate con ECP mostravano avere una soppressione di TNF α , IFN γ e IL-6, l'esecuzione della Northern blot rilevava una down-regulation dell'mRNA codificante per queste due citochine in entrambi i gruppi dei pazienti trattati, con notevole beneficio clinico; al contrario i monociti non trattati presentavano una amplificata trascrizione dei geni per il TNF α , l'IL-6 e IFN γ . In seguito ad ECP i linfociti non solo mostravano segni di apoptosi ma era anche presente un'incrementata espressione di MHC-I, contemporaneamente i monociti presentavano una rapida conversione fenotipica verso le cellule dendritiche con aumentata avidità fagocitica verso le cellule Th2 apoptotiche, processo che comporta la processazione e l'esposizione dell'antigene ai linfociti T CD8+ con conseguente immunità anticlonotipica in grado di reagire anche nei confronti delle cellule non trattate dalla ECP, con uno shift delle citochine Th2 verso le citochine Th1.

Numerosi studi prima di questo avevano notato la riduzione dei livelli di tali citochine dopo la reinfusione sia in vivo con il dosaggio ematico, sia in vitro, ma questo, per primo ha evidenziato che sia l'apoptosi che lo sviluppo dell'immunità anticlonotipica inizia a livello della buffy coat bag. A tale proposito numerose ipotesi sono state prese in considerazione [126].

I linfociti trattati durante ECP costituiscono circa il 10% della popolazione linfocitaria, quindi insufficienti per giustificare una immunogenicità indotta (autovaccinazione). Probabilmente la temperatura subfisiologica del sistema (29 gradi), la pompa peristaltica, il ricircolo, il bagno di citochine rilasciate dai monociti presenti nella sospensione, le modificazioni indotte nella espressività degli antigeni del complesso MHC-I determinano verosimilmente una rottura della immunotolleranza dalla proliferazione clonale delle cellule neoplastiche, ed uno stimolo all'attività cellulare citotossica CD8+ verso il clone cellulare proliferante [127].

7 - CONCLUSIONI

Nelle glomerulonefriti ritroviamo diversi aspetti anatomopatologici di patologia renale che si presentano con manifestazioni cliniche sostanzialmente accomunabili (ematuria, proteinuria, Sindrome nefrosica, Sindrome nefritica).

Il danno anatomico e la manifestazione clinica si determinano in seguito ad un insulto (antigene) noto o sconosciuto, in relazione a fattori genetici predisponenti ed in risposta alle difese messe in atto dal sistema immunitario.

A partire dagli anni ottanta alcuni lavori prospettavano una patogenesi immunologica delle glomerulonefriti, con la partecipazione di fattori plasmatici, linfociti, ed altri ancora.

Studi sperimentali di quel periodo hanno suggerito in pazienti con S. N. da Glomerulonefrite a lesioni minime alcune importanti considerazioni sui meccanismi patogenetici:

- La presenza di Fattori plasmatici inibenti la blastogenesi indotta dalla fitoemoagglutinina (FEA)
- I linfociti stimolati con FEA e con canavallina A liberano una linfocina che aumenta nelle cavie la permeabilità dei vasi dermici
- Un effetto tossico dei linfociti sugli endoteli renali

Tutto ciò porta alla stimolante ipotesi che ai linfociti spetti un ruolo nella determinazione della membrana basale del glomerulo e quindi nella sua permeabilizzazione.

Altre osservazioni come la tendenza della S. N. a comparire e a recidivare dopo infezioni virali e diatesi allergica, l'associazione con antigeni leucocitari umani (HLA) e la risposta terapeutica a cortisone ed immunosoppressori, indicano il possibile ruolo immunologico nella sua patogenesi.

Altresì è stata dimostrata una infiltrazione intra-renale di cellule T mentre non sono stati dimostrati complessi circolanti o in situ nei pazienti con sindrome nefrosica.

Si può ipotizzare, quindi, una liberazione patologica di uno o più fattori dai linfociti T CD8+, che poi alterino verosimilmente le caratteristiche strutturali e biochimiche della membrana basale glomerulare, favorendo il transito di proteine. Ipotetici fattori di permeabilità sono stati descritti anche in corso di Glomerulosclerosi focale e segmentale. Non vi sono prove dirette che nella patogenesi delle Glomerulonefriti siano implicati meccanismi immunologici e cellulari. Si è però osservato i linfociti di alcuni pazienti con GN acuta possono essere stimolati da antigeni streptococcici a produrre un fattore inibente i macrofagi.

Con il passare degli anni questo concetto di patogenesi immunologica delle glomerulonefriti risulta sempre più verosimile. Sin dal 1974, infatti, nella genesi della sindrome nefrosica sono stati implicati meccanismi immunomediati dai linfociti: Cellule T del sangue periferico di soggetti nefrosici (minimal change, GSFS e nefropatia membranosa idiopatica) riconoscono antigeni renali, come dimostrato dalle risposte delle citochine.

L'incubazione combinata di monociti con glomeruli isolati di ratto in vitro evidenzia l'incorporazione di solfato nelle glicoproteine glomerulari, come riprova dell'aumentata formazione di matrice extracellulare.

Nei pazienti con sindrome nefrosica acuta sono stati dimostrati elevati livelli circolanti di IL-2 di catene α del recettore solubile dell'IL2 e di cellule positive per CD25.

E' stata dimostrata in campioni di biopsie renali di soggetti con sindrome nefrosica idiopatica, indipendentemente dalla lesione istologica, la presenza di RNA messaggero α del recettore dell'IL2.

Altri lavori ancora focalizzano alcuni punti relativi alla patogenesi immunologica:

- Alcuni studi dimostrano che nelle Glomerulonefriti si ha una modificazione dell'immunità cellulare da potersi correlare con la patogenesi della malattia. Tale alterazione dell'immunità cellulo-mediata nella GN a lesioni minime è dimostrata dall'aumento, in corso di recidiva, nel siero e nelle urine di livelli di neopterina, (prodotta dalle cellule T attivate).
- Le cellule T di pazienti con sindrome nefrosica dell'infanzia mostrano una alterazione dell'espressione genotipica del gene V, con evidenze di espansione

clonale. I linfociti causano in questi soggetti una diminuzione del contenuto di eparin-solfato nei glomeruli immessi in un sistema di coltura in vitro.

- Colture di cellule T di pazienti con Glomerulonefriti a lesioni minime liberano in vitro un fattore di permeabilità vascolare che può essere inibito dal TGF- β 1.
- Si può ipotizzare la liberazione patologica di uno o più fattori dai linfociti T (CD8+) (in corso di Glomerulonefrite a lesioni minime), che poi alterino reversibilmente le caratteristiche biochimiche e/o la carica della parete dei capillari per favorire il transito transcapillare di proteine polianioniche (albumina).
- Ipotetici fattori di permeabilità sono stati descritti anche in corso di altre forme di sindrome nefrosica come nella sclerosi focale (probabilmente lo stadio successivo di uno stesso processo, più grave, che presenta le medesime manifestazioni cliniche).

A questo possiamo anche aggiungere altri studi secondo i quali:

- La nefropatia da IgA e la Porpora di Schonlein-Henoch sono disordini correlati con aspetto istologico simile (occasionalmente la Nefropatia da IgA o la Porpora di S.H. può essere associata a lesioni glomerulari che assomigliano alla MPGN tipo III).
- Alcuni malati con nefrite anti-MBG producono un fattore inibente i macrofagi (MIF) quando stimolati da membrane basali glomerulari solubilizzate.
- Ratti con Nefrite di Heymann presentano cutireazione ritardate positive ed una stimolazione linfocitaria quando sono esposti agli Ag dell'epitelio tubulare prossimale.

In definitiva possiamo quindi ritenere che la patogenesi immunologia rivesta un ruolo fondamentale nelle glomerulonefriti, infatti:

- La patogenesi delle GSFS è in gran parte sconosciuta.
- L'aumentata permeabilità dei capillari glomerulari è correlata alla produzione di linfocine od altro meccanismo umorale.
- Nella Glomerulonefrite di Goodpasture (anticorpi antimembrana basale) è coinvolta l'immunità mediata delle cellule T nei confronti degli antigeni della GBM. Le cellule T autoreattive CD4+ sono aumentate e sono di supporto alle cellule B autoreattive nella produzione di autoanticorpi e il non riuscire

adeguatamente ad eliminare o sopprimere queste cellule T autoreattive può essere responsabile delle recidive. Da ricordare che il titolo anticorpale anti GBM non ha influenza sulla prognosi.

Pertanto, detto che la patogenesi della glomerulonefriti primitive è in gran parte sconosciuta, sappiamo comunque che l'aumentata permeabilità dei capillari glomerulari è correlata alla produzione di linfocine proinfiammatorie prodotte dai linfociti T che sono iperespressi (RANTES); non riuscire ad eliminare adeguatamente queste cellule può essere quindi causa di recidive.

Il meccanismo attivato a livello renale dopo l'insulto prevede la produzione di chemioattrattine, citochine, fattori di adesione etc. da parte dei macrofagi glomerulari determinando la chemiotassi delle cellule mononucleate con risultato finale di infiltrazione renale ed amplificazione della risposta immunitaria.

In definitiva si può ipotizzare che dalla lesione renale a seguito dell'insulto si ha l'attivazione dei linfociti T che amplificano il danno renale. La ECP determina la lisi del linfocita liberando peptidi antigenici che vengono catturati dalle APC maggiormente sensibilizzate dalla temperatura del sistema e quindi con maggiore esposizione di MHC e successivamente presentati al linfocita. Pertanto, il linfocita T non attivato si lega all'antigene presentato per aggredire successivamente la cellula alterata, amplificante il danno.

Nonostante la scarsa casistica ed i risultati ancora incompleti, alla luce di questi dati preliminari si può dire che i risultati iniziali siano particolarmente positivi ed incoraggianti.

Fondamentale, è riuscire ad iniziare tempestivamente tale terapia, ovvero prima dell'instaurarsi di un danno d'organo irreversibile, per il quale non esiste trattamento che possa portare una completa *restituito ad integrum*.

8 – BIBLIOGRAFIA

- 1.** Brenner BM, Rector FC Jr: Glomerulonefriti primitive. The kidney. Volume 2. 1995; 1257 - 1259.
- 2.** Glassock RJ, Adler SG, Ward HJ, Cohen AH: Primary glomerular diseases. In *Brenner and Rector (eds): The kidney, 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia, 1996, p. 929.*
- 3.** Hudson BG, Wieslander J, Wisodom BJ, Noelken ME: Biology of disease. Goodpasture's syndrome: Molecular architecture and function of basement membrane antigen. *Lab. Invest.* 61:256, 1989.
- 4.** Cameron JS, Glassock RJ: The Nephrotic Syndrome. Marcel Dekker, New York, 1998.
- 5.** Rosen S, Galvanek E, Levy M, Habib R: Glomerular disease. *Hum. Pathol.* 12:964, 1989
- 6.** Rosen S: Classification of glomerular disease. In *Rosen S (ed.): Pathology of Glomerular Disease. Churchill Livingstone, New York, 1993, p. 1.*
- 7.** Perez-Fontan M, Huarte E, Tellez A, et al.: Glomerular nephropaty associated with chronic Q fever. *Am. J. Kidney Dis.* 11:298, 1988
- 8.** Fraser JRE, Cunnighan AL, Muller HK, et al.: Glomerulonephritis in the acute phase of Ross River virus disease. *Clin. Nephrol.* 29:149, 1988.
- 9.** Brady HR, Brenner BM: Meccanismi patogenetici di danno glomerulare. *Harrison, Principi di medicina interna. Volume 2. 2002; 1828 – 1831.*
- 10.** Appel G, Rishman JR: Secondary Glomerular Diseases, In *Brenner & Rector's The Kidney, 6th ed, Brenner BM (ed.). Philadelphia, Saunders, 2000, pp. 1350–1448.*
- 11.** Falk R et al.: Primary Glomerular Diseases, In *Brenner & Rector's The Kidney, 6th ed, Brenner BM (ed.). Philadelphia, Saunders, 2000, pp. 1263–1349.*
- 12.** Kitamura M, Fine LH: The concept of glomerular self-defense. *Kidney Int.* 55:1999; 1639.
- 13.** Savin NJ et al.: Circulatig factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 1996, 334:878.

- 14.** Schena FP, Selvaggi FP, Montanaro V: Insufficienza renale cronica. *Malattie dei reni e delle vie urinarie*. 2004; 313–314.
- 15.** Bonomini V, Vangelista A, Stefoni S: Insufficienza renale cronica, cap 13. In *Nefrologia Clinica, Soc. Ed. Esculapio, Bologna 1990, pp. 225–246*.
- 16.** Klahr s, Schreiner G, Ichikawa I: The progression of renal disease. *N. Engl. J. Med.*, 1988, 318:1657 – 1666.
- 17.** Schena FP, Selvaggi FP, Montanaro V, Gesualdo L: Meccanismi immunologici delle glomerulonefriti. In *Bonomo L: Immunologia Clinica, UTET, 1992, pp. 695 – 706*.
- 18.** Schena FP: IgA Nephropathies. In Cameron SN, Davison JP et al.: *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. Oxford Medical Publications, 1992, pp. 339 – 369.
- 19.** Rippe B: What is the role of albumin in proteinuric glomerulopathies?. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19: 1–5
- 20.** UpToDate 2004
- 21.** Couser, WG. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(Suppl 1):10
- 22.** Couser, WG. Mediation of immune glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1:13.
- 23.** Couser, WG. Mechanisms of glomerular injury in immune complex glomerulonephritis. *Kidney Int* 1985; 28:569.
- 24.** Couser, WG. Glomerulonephritis. *Lancet* 1999; 353:1509.
- 25.** Rees, AJ. Immunogenetics of renal disease. In: *Immunologic Renal Diseases, Neilson, EG, Couser, WG (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, p. 99*.
- 26.** Couser, WG. Research opportunities and future directions in glomerular disease. *Semin Nephrol* 1993; 13:457.
- 27.** Hudson, BG, Kalluri, R, Gunwar, S, et al. Molecular characteristics of the Goodpasture autoantigen. *Kidney Int* 1993; 43:135.
- 28.** Berden, JH. Lupus nephritis. *Kidney Int* 1997; 52:538.
- 29.** Stehman-Breen, C, Johnson, RJ. Hepatitis C virus-associated glomerulonephritis. *Adv Intern Med* 1998; 43:79.

- 30.** Couser, WG, Salant, DJ. In situ immune complex formation and glomerular injury (editorial review). *Kidney Int* 1980; 17:1.
- 31.** Johnson, RJ. The glomerular response to injury: Mechanisms of progression or resolution. *Kidney Int* 1994; 45:1769.
- 32.** Brady, HR. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int* 1994; 45:1285.
- 33.** Adler, S, Brady, HR. Cell adhesion molecules and the glomerulopathies. *Am J Med* 1999; 107:371.
- 34.** Salant, DJ, Adler, S, Darby, C, et al. Influence of antigen distribution on the mediation of immunologic glomerular injury. *Kidney Int* 1985; 27:938.
- 35.** Foster, MH, Madaio, MP. Molecular structure and expression of nephritogenic autoantibodies in immune renal diseases. In: *Immunologic Renal Diseases*, Neilson, EG, Couser, WG (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, p. 265.
- 36.** Rosenkranz, AR, Knight, S, Sethi, S, et al. Regulatory interactions of alphabeta and gammadelta T cells in glomerulonephritis. *Kidney Int* 2000; 58:1055.
- 37.** Couser, WG. Glomerulonephritis. *Lancet* 1999; 353:1509.
- 38.** Ali AA, Wilson E, Moorhead JF. Minimal-change glomerular nephritis. Normal kidneys in an abnormal environment. *Transplantation* 1994; 58:849.
- 39.** Hoyer JR, Raij L, Vernier RL, et al. Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation. *Lancet* 1972; II:343.
- 40.** Savin VJ, Sharma R, Sharma M., et al. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 1996; 334:878.
- 41.** Koyama A, Fukisaki M, Koboyashi M, Igarashi M, et al. A glomerular permeability factor produced by human T cell hybridomas. *Kidney Int* 1991; 40:453.
- 42.** Dantal J, Bigot E, Gogers W, et al. Effect of plasma protein absorption on transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 1994; 330:7.
- 43.** Mendrick DL, Rennke HG. Induction of proteinuria in the rat by a monoclonal antibody against SPG-115-107. *Kidney Int* 1988; 33:818.
- 44.** Holthofer H, Ahola H, Solin ML, et al. Nephritin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am J Pathol* 1999; 155:1681.

45. Shih NY, Li J, Karpitskii V, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999; 286:312.
46. Kawachi H, Koike H, Yaoita E, et al. Cloning of rat nephrin and its expression and localization in proteinuric states (abstract). *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:550.
47. Luimula P, Ahola H, Wang SX, et al. Nephrin in experimental glomerular disease [In *Process Citation*]. *Kidney Int* 2000; 58:1461.
48. Furness PN, Hall LL, Shaw JA, Pringle JH. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:1234.
49. Couser WG, Abrass CK. Pathogenesis of membranous nephropathy. *Annu Rev Med* 1988; 39:517.
50. Farquhar M, Saito A, Kerjaschki D, Orlando R. The Heymann nephritis antigenic complex: Megalin (gp330) and RAP. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6:35.
51. Falk RJ, Dalmaso AP, Kim Y, et al. Neoantigen of the polymerized ninth component of complement. Characterization of a monoclonal antibody and immunohistochemical localization in renal disease. *J Clin Invest* 1983; 72:560.
52. Kerjaschki D, Schulze M, Binder S, et al. Transcellular transport and membrane insertion of the C5b-9 membrane attack complex of complement by glomerular epithelial cells in experimental membranous nephropathy. *J Immunol* 1989; 143:546.
53. Couser WG. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(Suppl 1):10.
54. Neale TJ, Ullrich R, Ojha P, et al. Expression of a neutrophil respiratory burst cytochrome and reactive oxygen species in kidney glomeruli in association with proteinuria in passive Heymann nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:3645.
55. McMillan JI, Riordan JW, Couser WG, et al. Characterization of a glomerular epithelial cell metalloproteinase as matrix metalloproteinase-9 with enhanced expression in a model of membranous nephropathy. *J Clin Invest* 1996; 97:1094.
56. Shankland SJ, Pippin JW, Couser WG. Complement (C5b-9) induces glomerular epithelial cell DNA synthesis but not proliferation in vivo. *Kidney Int* 1999; 56:538.
57. Shankland SJ, Pippin J, Pichler RH, et al. Differential expression of transforming growth factor - isoforms and receptors and experimental membranous nephropathy. *Kidney Int* 1996; 50:116.

- 58.** Pruchno C, Burns M, Schulze M, et al. Urinary excretion of C5b-9 membrane attack complex of complement is a marker of immune disease activity in autologous immune complex nephritis. *Am J Pathol* 1991; 138:203.
- 59.** Schulze M, Donadio J, Pruchno C, et al. Elevated urinary excretion of the C5b-9 complex in membranous nephropathy. *Kidney Int* 1991; 40:533.
- 60.** Brandt J, Pippin J, Schulze M, et al. Role of the complement membrane attack complex (C5b-9) in mediating experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; 49:335.
- 61.** Nangaku M, Alpers CE, Pippin J, et al. Renal microvascular injury induced by antibody to glomerular endothelial cells is mediated by C5b-9. *Kidney Int* 1997; 52:1570.
- 62.** Quigg CJ, He C, Lim A, et al. Transgenic mice overexpressing the complement inhibitor Crry as a soluble protein are protected by antibody-induced glomerular injury. *J Exp Med* 1998; 188:1321.
- 63.** Hebert M-J, Takano T, Papayianni A, et al. Acute nephrotoxic serum nephritis in complement knockout mice: Relative roles of the classical and alternate pathways in neutrophil recruitment and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:2799.
- 64.** Lan HY, Bacher M, Yang N, et al. The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J Exp Med* 1997; 185:1455.
- 65.** Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, et al. Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest* 1999; 103:627.
- 66.** Johnson RJ, Klebanoff SJ, Couser WG. Neutrophils (Chapter 25). In: *Immunologic Renal Diseases*. Neilson, EG, Couser, WG, (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia 1997. p. 541.
- 67.** Adler S, Brady HR. Cell adhesion molecules and the glomerulopathies. *Am J Med* 1999; 107:371.
- 68.** Sethi S, Knight SR, Robinson SD, et al. A role for L-selectins in immune mediated experimental glomerulonephritis (abstract). *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:499A.
- 69.** Johnson RJ, Couser WG, Chi EY, et al. A new mechanism for glomerular injury: A myeloperoxidase (MPO)-hydrogen peroxide-halide system. *J Clin Invest* 1987; 79:1379.
- 70.** Suzuki S, Gejyo F, Kuroda T, et al. Effects of a novel elastase inhibitor, ONO-5046, on nephrotoxic serum nephritis in rats. *Kidney Int* 1998; 53:1201.

- 71.** Hooke DH, Gee DC, Atkins RC, et al. Leukocyte analysis using monoclonal antibodies in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 1987; 31:964.
- 72.** Rastaldi MP, Ferrario F, Crippa A, et al. Glomerular monocyte-macrophage features in ANCA-positive renal vasculitis and cryoglobulinemic nephritis [*In Process Citation*]. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:2036.
- 73.** Atkins RC, Nikolic-Patterson DJ, Song Q, et al. Modulators of crescentic glomerulonephritis (editorial review). *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:2271.
- 74.** Wada T, Furuichi K, Segawa-Takaeda C, et al. MIP-1alpha and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 56:995.
- 75.** Lan HY, Yu XQ, Yang N, et al. De novo glomerular osteopontin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998; 53:136
- 76.** Okada H, Moriwaki K, Konishi K, et al. Tubular osteopontin expression in human glomerulonephritis and renal vasculitis. *Am J Kidney Dis* 2000; 36:498.
- 77.** Rennke HG, Klein PS, Sandstrom DJ, et al. Cell-mediated immune injury in the kidney: Acute nephritis induced in the rat by azobenzenearsonate. *Kidney Int* 1994; 45:1044.
- 78.** Aruela-Arispe L, Gordon K, Hugo C, et al. Participation of glomerular endothelial cells in the capillary repair of glomerulonephritis. *Am J Pathol* 1995; 147:1715.
- 79.** Nangaku M, Alpers CE, Pippin J, et al. A new model of renal microvascular endothelial injury. *Kidney Int* 1997; 52:182.
- 80.** Sterzel RB, Rupperecht HD. Glomerular mesangial cells. In: *Immunologic Renal Diseases*, Neilson, EG, Couser, WG (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, p. 595.
- 81.** Johnson RJ (Nephrology Forum). The glomerular response to injury: Mechanisms of progression or resolution. *Kidney Int* 1994; 45:1769.
- 82.** Johnson RJ, Raines EW, Floege J, et al. Inhibition of mesangial cell proliferation and matrix expansion in glomerulonephritis in the rat by antibody to platelet-derived growth factor. *J Exp Med* 1992; 175:1413.
- 83.** Shankland SJ, Hugo CH, Coats SR, et al. Changes in cell cycle regulatory protein expression during experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; 50:1230.
- 84.** Pippin JW, Qu Q, Meijer L, et al. Direct in vivo inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with

Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist. *J Clin Invest* 1997; 100:2512.

- 85.** Ophascharoensuk V, Fero ML, Hughes J, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip 1) safeguards against inflammatory injury. *Nat Med* 1998; 4:575.
- 86.** Nikolic-Paterson DJ, Lan HY, Atkins RC. Macrophages in immune renal injury. In: *Immunologic Renal Diseases*. Neilson, EG, Couser, WG (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia 1997. p.575.
- 87.** Morrin PA, Hinglais N, Nabarra B, Kreis H. Rapidly progressive glomerulonephritis. A clinical and pathologic study. *Am J Med* 1978; 65:446.
- 88.** Whitworth JA, Morel-Maroger L, Mignon F, Richet G. The significance of extracapillary proliferation. Clinicopathological review of 60 patients. *Nephron* 1976; 16:1.
- 89.** Couser WG. Glomerulonephritis. *Lancet* 1999; 353:1509.
- 90.** Bonsib S. Glomerular basement membrane discontinuities: Scanning electron microscopic study of acellular glomeruli. *Am J Pathol* 1985; 119:357.
- 91.** Morel-Maroger Striker L, Killen PD, Chi E, Striker GE. The composition of glomerulosclerosis, crescentic glomerulonephritis, and membranoproliferative glomerulonephritis. *Lab Invest* 1984; 51:181.
- 92.** Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC. Involvement of activated periglomerular leukocytes in the rupture of Bowman's capsule and crescent progression in experimental glomerulonephritis. *Lab Invest* 1992; 67:743
- 93.** Naish P, Penn GB, Evans DJ, Peters DK. The effect of defibrination on nephrotoxic serum nephritis in rabbits. *Clin Sci* 1972; 42:643.
- 94.** Thomson NM, Moran J, Simpson IJ, Peters DK. Defibrination with ancrod in nephrotoxic nephritis in rabbits. *Kidney Int* 1976; 10:343.
- 95.** Tipping PG, Erlich JH, Apostolopoulos J, et al. Glomerular tissue factor expression in crescentic glomerulonephritis. Correlations between antigen, activity and mRNA. *Am J Pathol* 1995; 147:1736.
- 96.** Neale TJ, Tipping PG, Carson SD, Holdsworth SR. Participation of cell-mediated immunity in deposition of fibrin in glomerulonephritis. *Lancet* 1988; 2:421.
- 97.** Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134:1087.

- 98.** Erlich JH, Apostolopoulos J, Wun TC, et al. Renal expression of tissue factor pathway inhibitor and evidence for a role in crescentic glomerulonephritis in rabbits. *J Clin Invest* 1996; 98:325.
- 99.** Cunningham MA, Ono T, Hewitson TD, et al. Tissue factor pathway inhibitor expression in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 55:1311.
- 100.** Kitching AR, Holdsworth SR, Ploplis VA, et al. Plasminogen and plasminogen activators protect against renal injury in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med* 1997; 185:1.
- 101.** Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ, Song Q, Lan HY. Modulators of crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:2271.
- 102.** Tipping PG, Holdsworth SR. The participation of macrophages, glomerular procoagulant activity and factor VIII in glomerular fibrin deposition: Studies in anti-glomerular basement membrane antibody induced glomerulonephritis in rabbits. *Am J Pathol* 1986; 124:10.
- 103.** Lloyd CM, Dorf ME, Proudfoot A, et al. Role of MCP-1 and RANTES in inflammation and progression to fibrosis during murine crescentic nephritis. *J Leukoc Biol* 1997; 62:676.
- 104.** Lan HY, Yu XQ, Yang N, et al. De novo glomerular osteopontin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998; 53:136.
- 105.** Wada T, Furuichi K, Segawa-Takaeda C, et al. MIP-1-alpha and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 56:995.
- 106.** Hudkins KL, Giachelli CM, Eitner F, et al. Osteopontin expression in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 2000; 57:105.
- 107.** Nishikawa K, Guo YJ, Miyasaka M, et al. Antibodies to intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 prevent crescent formation in rat autoimmune glomerulonephritis. *J Exp Med* 1993; 177:667.
- 108.** Adler S, Brady HR. Cell adhesion molecules and the glomerulopathies. *Am J Med* 1999; 107:371.
- 109.** Segerer S, Cui Y, Hudkins KL, et al. Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis [In Process Citation]. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:2231.
- 110.** Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, et al. Local macrophage proliferation in the pathogenesis of glomerular crescent formation in rat anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* 1997; 110:233.

- 111.** Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, et al. Interleukin-1 receptor antagonist halts the progression of established crescentic glomerulonephritis in the rat. *Kidney Int* 1995; 47:1303.
- 112.** Lan HY, Yang N, Metz, et al. TNF-alpha upregulates renal MIF expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Mol Med* 1997; 3:136.
- 113.** Border WA, Noble NA. Transforming growth factor in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331:1286.
- 114.** Isaka Y, Akagi Y, Ando Y, et al. Gene therapy by transforming growth factor-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 55:465.
- 115.** Li HL, Hancock WW, Dowling JP, Atkins RC. Activated (IL-2R+) intraglomerular mononuclear cells in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1991; 39:793.
- 116.** Boucher A, Droz D, Adafer E, Noel H. Relationship between the integrity of Bowman's capsule and the composition of cellular crescents in human crescentic glomerulonephritis. *Lab Invest* 1987; 56:526.
- 117.** Cunningham MA, Huang XR, Dowling JP, et al. Prominence of cell-mediated immunity effectors in "pauci-immune" glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:499.
- 118.** Kitching, AR, Holdsworth, SR, Tipping, PG. IFN-gamma mediates crescent formation and cell-mediated immune injury in murine glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:752.
- 119.** Ng Y, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, et al. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in the progression of rat crescentic glomerulonephritis. *Nephrology* 1995; 1:569.
- 120.** Nitta K, Horita S, Honda K, et al. Glomerular expression of cell-cycle-regulatory proteins in human crescentic glomerulonephritis. *Virchows Arch* 1999; 435:422.
- 121.** Wiggins RC, Holzman LB, Legault DJ. Glomerular inflammation and crescent formation. In: *Immune Renal Diseases. Neilson, EG, Couser, WG (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, p. 669.*
- 122.** D'Amico G, Colasanti G, Bestetti-Bosisio M: Terapia delle glomerulonefriti. Le glomerulonefriti primitive: *La medicina internazionale* 1977; 93 – 107.
- 123.** John A et al: The north american experience with photopheresis. *Therapeutic Apheresis* 1999; 3(1):50-62.

- 124.** Alain H. Rook et al: Photopheresis: Clinical application and mechanism of action. The society for Investigative Dermatology,1999; vol 4 n 1.
- 125.** Shephard S. E. et al: Pharmacokinetics of 8-methoxypsoralen during extracorporeal photopheresis. Photodermatol Photoimmunol Photomed 1999; 15: 64-74.
- 126.** John Bladon et al: Extracorporeal photopheresis reduces the number of mononuclear cells that produces pro-inflammatory cytokines, when tested ex-vivo. Journal of clinical apheresis 2002, 17:177.182.
- 127.** J. Blandon and P. C. Taylor: Lymphocytes treated by extracorporeal photopheresis demonstrate a drop in the Bcl-2/Bax ratio: a possible mechanism involved in ECP induced apoptosis. Dermatology,2002, 204: 104-107.