

Expression and Activation of Glucocorticoids Receptor and Expression of Heat Shock Protein-90 of Lymphocyte Cell in Idiopathic Nephrotic Syndrome Patient

Ekspresi dan Aktivasi Reseptor Glukokortikoid serta Ekspresi *Heat Shock Protein-90* pada Sel Limfosit Penderita Sindrom Nefrotik Idiopatik

Khairiyadi*, Krisni Subandiyah**, Loeki Enggar Fitri***

*RSUD Ulin Balikpapan

**Departemen Ilmu Kesehatan Anak RSSA/Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

***Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRACT

Glucocorticoid receptors (GR) have an important role in the resistance of steroid therapy. Previous studies showed significant difference activation and expression of GR between Steroid Resistant Nephrotic Syndrome (SRNS) and Steroid Sensitive Nephrotic Syndrome (SSNS), however the other studies showed contrastive result. Previous studies also revealed Hsp-90 had an important role in GR activation. The aim of this study was to determine the differences expression and activation of GR and also Hsp-90 expression in lymphocytes cytoplasm and nucleus between SRNS and SSNS patients. A Cross-sectional study was conducted to 40 children (20 SRNS and 20 SSNS patients). Double staining immunocytochemistry of lymphocytes was performed. The GR expression and activation were determined by counting amount of lymphocytes that express GR and Hsp-90 among 200 under light microscope with 1000x magnification. The differences of activation and activation of GR and Hsp-90 in cytoplasm and nucleus were analyzed with independent t-test and the correlation was analyzed with Pearson correlation. The study results showed the GR expression and also the Hsp-90 in cytoplasm and nucleus in SRNS was lower than SSNS group ($p < 0.05$). There was no significant difference of GR activation ($p = 0.347$) and no correlation between GR and Hsp-90 in cytoplasm ($r = 0.124$).

Keywords: GR expression, GR activation, Hsp-90 in cytoplasm, Hsp-90 in nucleus, SSNS, SRNS

PENDAHULUAN

Respon terhadap terapi glukokortikoid adalah suatu indikator yang penting untuk perjalanan penyakit sindrom nefrotik (1). Penderita SNRS mempunyai prognosis yang lebih buruk dibandingkan dengan penderita sindrom nefrotik yang sensitif dengan terapi steroid (2-5). Pada penelitian jangka panjang selama 10 tahun didapatkan sekitar 50% pasien dengan SNRS berakhir dengan gagal ginjal *terminal*. Pada pengamatan terhadap pasien sensitif steroid didapatkan 73% pasien tanpa gangguan ginjal selama 5 tahun, 58% bertahan selama 10 tahun dan 51% selama 15 tahun (6).

Beberapa penelitian menunjukkan reseptor glukokortikoid berperan terhadap resistensi terapi steroid (7-9). Hasil penelitian menunjukkan jumlah atau densitas dari reseptor glukokortikoid (GR) menentukan respon terhadap terapi kortikosteroid, dimana ekspresi GR yang lebih rendah didapatkan pada Sindrom Nefrotik Resisten Steroid (SNRS) (2,10,11). Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna pada ekspresi GR (12,13). *Heat Shock Protein-90* (Hsp-90) adalah *chaperon* yang mempertahankan bentuk molekul GR. HSP-90 berperan penting pada proses transportasi GR dari sitoplasma ke nukleus atau proses aktivasi, sebagai pembuka sinyal transportasi ke nukleus (14). Hasil yang berbeda didapatkan pada

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXV, No. 3, Desember 2009; Korespondensi: Khairiyadi, Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Jln. Veteran, Malang. Tel. +6285234908835, Email: khairiyadi_unibra@yahoo.co.id

penelitian Tago (2004) dan Quyang (2006), yang menyatakan bahwa HSP-90 dapat menghambat kerja GR di nukleus bila terjadi *over expressi* (12,13).

Berdasarkan hal tersebut di atas pada penelitian ini akan diteliti peranan ekspresi dan aktivasi GR serta ekspresi HSP-90 terhadap respon pengobatan glukokortikoid pada terapi sindrom nefrotik idiopatik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya peranan reseptor glukokortikoid dan Hsp-90 pada respon terapi sindrom nefrotik dengan melihat perbedaan ekspresi dan aktivasi GR pada SNRS dan SNSS serta ekspresi Hsp-90 pada sitoplasma dan nukleus limfosit penderita sindrom nefrotik.

METODE

Penelitian ini mengkaji ekspresi dan aktifasi GR, serta ekspresi Hsp-90 pada sitoplasma dan nukleus limfosit penderita SNRS. Penelitian ini akan diselesaikan dalam waktu 1 tahun. Penelitian dilakukan di Laboratorium / SMF Ilmu Kesehatan Anak RSUD Dr. Saiful Anwar Malang dan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, mulai bulan Januari 2009 sampai dengan Desember 2009 dan sudah mendapat persetujuan Panitia Etik Penelitian Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya RSUD Dr. Saiful Anwar Malang. Semua penderita sindrom nefrotik idiopatik dijelaskan mengenai penelitian dan diminta menandatangani persetujuan dari orang tua (*informed consent*).

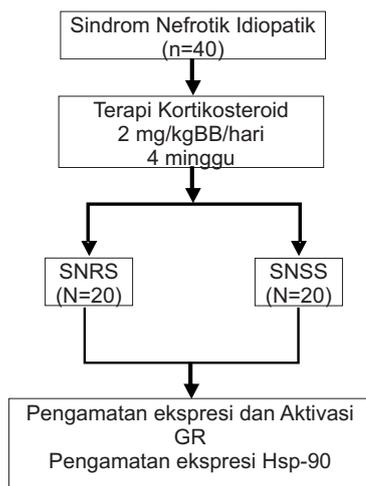
Penelitian ini menggunakan rancangan *cross sectional*. Populasi subyek penelitian adalah penderita sindrom nefrotik idiopatik yang dirawat

di Laboratorium/SMF Ilmu Kesehatan Anak RSUD Saiful Anwar Malang. Kriteria diagnosis sindrom nefrotik sesuai dengan Unit Kerja Koordinasi Nefrologi Ikatan Dokter Anak Indonesia yaitu edema, proteinuria massif (2+ atau pemeriksaan kuantitatif 40 mg/m²LPB/jam atau 1g/L dalam 24 jam/ Esbach), hipoalbuminemia 2,5 g/dL, hiperkolesterolemia (>250 mg/dL).

Pasien penelitian dibagi menjadi 2 kelompok, dengan kriteria inklusi yaitu tergolong sindrom nefrotik idiopatik; penderita SNSS; dan SNRS; usia antara 1 sampai 14 tahun. Kriteria eksklusi adalah penderita sindrom nefrotik sekunder, yaitu sindrom nefrotik yang penyebabnya berasal dari luar ginjal seperti terpapar oleh zat kimia/obat-obatan, berasal dari penyakit sistemik seperti, lupus eritematosus, purpura Henoch Schonlein, penyakit infeksi seperti malaria, hepatitis; penderita sindrom nefrotik kongenital/sindrom nefrotik *infantile* yaitu sindrom nefrotik yang mulai menunjukkan gejala dalam tahun pertama kehidupan.

Kelompok I adalah penderita sindrom nefrotik idiopatik resisten steroid. Kriteria sindrom nefrotik resisten steroid adalah tidak terjadi remisi pada pengobatan prednison dosis penuh (*full dose*) 2 mg/kgBB/hari selama 4 minggu. Kelompok II adalah penderita sindrom nefrotik sensitif steroid. Kriteria sindrom nefrotik sensitif steroid adalah terjadi remisi pada pengobatan prednison dosis penuh (*full dose*) 2 mg/kgBB/hari selama 4 minggu. Adapun remisi adalah proteinuria negatif atau *trace* (proteinuria < 4 mg/m²LPB/jam) 3 hari berturut-turut dalam 1 minggu.

Sampel diambil berdasarkan *consecutive sampling*, yaitu berdasarkan jumlah pasien yang ada selama waktu penelitian (Januari 2009 sampai dengan Desember 2009) dengan total sampel pasien SNRS 20 orang dan pasien SNSS 20 orang. Total sampel yang digunakan sebanyak 40 orang (Gambar 1).



Gambar 1. Alur Penelitian.

Sampel penelitian berupa darah vena pasien SNRS (kelompok I) dan SNSS. Sampel darah tersebut dilakukan prosedur isolasi sel limfosit dan dibuat hapusan darahnya. Dilakukan pengecatan menggunakan metode *double staining*

imunositokimia.

Hasil pengecatan dibaca dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Jumlah GR dinyatakan dengan penghitungan jumlah sel limfosit yang tercatat coklat pada sitoplasma dan inti per 200 sel limfosit. Jumlah ekspresi Hsp-90 dinyatakan dengan penghitungan jumlah sel limfosit yang tercatat merah muda pada sitoplasma dan inti per 200 sel limfosit (lihat gambar 2). Hasil penghitungan tersebut dijadikan variabel numerik digunakan dalam bentuk mean/erata (SD). Komparatif *mean* diantara 2 kelompok digunakan statistika non parametrik uji t-test dan uji korelasi Pearson dengan nilai interval kepercayaan 95%. Semua data dianalisa menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 15) for Windows*. Signifikan/ bermakna bila menghasilkan nilai $p < 0,05$.

HASIL

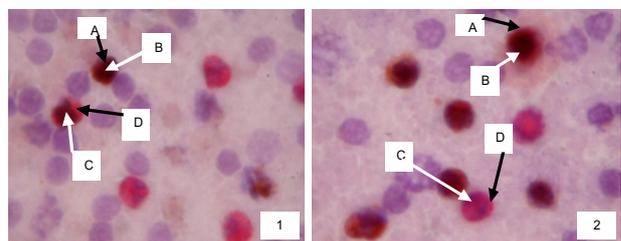
Karakteristik sampel penderita yang pada penelitian ini dapat terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Penderita SNSS dan SNRS

	SNRS (n= 20)	SNSS (n= 20)	p
Jenis kelamin			0,513
Laki-laki	12	14	
Perempuan	8	6	
Rata-rata umur pasien (tahun)	7,8 th	5,9 th	0,127
Rata-rata Berat badan (kg)	23,86	18,88	0,223

Keterangan : dikatakan ada perbedaan bermakna jika nilai $P \leq 0,05$

Tabel 1 menggambarkan karakteristik penderita sindrom nefrotik idiopatik yang menjadi sampel pada penelitian ini. Karakteristik penderita yang menjadi sampel penelitian ini untuk jenis kelamin, umur dan berat badan tidak ada perbedaan yang bermakna.



Gambar 2. Hasil pengecatan *double staining* imunositokimia GR dan Hsp-90 pada hapusan darah penderita.

Keterangan : (1) Hasil pengecatan *double staining* imunositokimia GR dan hsp-90 pada penderita SNSS ; (2) Hasil pengecatan *double staining* imunositokimia GR dan hsp-90 pada penderita SNRS ;(A) GR sitoplasma yang terlihat sebagai warna coklat pada sitoplasma ; (B) GR inti yang terlihat sebagai warna coklat pada inti ; (C) hsp-90 yang terlihat sebagai warna merah pada inti (D) hsp-90 pada sitoplasma yang tercatat dengan warna merah.

Hasil *double staining* imunositokimia reseptor

Hasil penghitungan statistik dengan menggunakan uji beda *independent t-test* untuk ekspresi GR pada penderita SNSS dan SNRS disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Penghitungan *Independent Sample t-test*

	Kelompok Sampel	Nilai rata-rata	Independent t-test Sig. (2-tailed) P
Ekspresi GR	SNSS	37,0000	0,000
	SNRS	26,2000	0,000
Aktivasi GR	SNSS	33,2500	0,347
	SNRS	31,7500	0,347
Hsp-90 sitoplasma	SNSS	31,0000	0,000
	SNRS	14,7500	0,000
Hsp-90 inti	SNSS	5,8500	0,000
	SNRS	15,1000	0,000

Hasil uji beda menunjukkan perbedaan bermakna ekspresi GR, Hsp-90 sitoplasma, dan Hsp-90 inti antara kelompok SNSS dan SNRS. Ekspresi GR dan Hsp-90 sitoplasma pada SNRS lebih rendah dibandingkan dengan pada SNRS.

DISKUSI

Sindrom nefrotik idiopatik merupakan suatu penyakit yang dipengaruhi sistem imun. Sampai saat ini kortikosteroid masih menjadi pilihan terapi lini pertama (15,16). Glukokortikoid mempunyai efek sebagai anti inflamasi yang kuat yang mekanismenya kerja glukokortikoid terutama melalui efek genomik yang dimediasi oleh GR (12,13,17).

Hasil penelitian ini menunjukkan ada perbedaan yang bermakna pada ekspresi GR antara SNRS dan SNSS. Pada SNRS didapatkan ekspresi GR lebih rendah dibandingkan dengan SNSS. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Bagasarova (1991) yang menunjukkan bahwa pada penderita glomerulonefritis yang resisten steroid memiliki GR yang lebih rendah dibandingkan dengan penderita yang sensitif dengan steroid (2). Burnstein & Cidlowski (1992), menyatakan, penurunan densitas GR berhubungan dengan resistensi steroid (18). Penelitian Han, *et al.* (2008) yang meneliti ekspresi GR pada glomerulus penderita sindrom nefrotik menunjukkan hasil pada penderita sindrom nefrotik kelainan minimal dengan respon lambat terhadap steroid didapatkan ekspresi GR yang lebih rendah (19). Hal ini menunjukkan semakin sensitif penderita terhadap steroid semakin tinggi ekspresi GR demikian pula sebaliknya.

Hal yang bertentangan dengan hasil penelitian di atas didapatkan pada penelitian Haack (1999), Tago (2004) dan Quyang (2006) yang menyatakan bahwa pada kelompok penderita SNRS didapatkan ekspresi GR yang lebih rendah tapi yang secara statistik tidak didapatkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok SNSS (12, 13, 20).

Menurut Wasilewska *et al.*, (2003) yang meneliti pada penderita sindrom nefrotik dan Berki (2002) yang meneliti pada penderita rheumatoid arthritis,

mengemukakan bahwa hal yang mempengaruhi ekspresi GR sampai sekarang masih belum diketahui, tetapi kemungkinan kadar kortisol berperan terhadap *downregulation* GR. Pada penelitian mereka didapatkan ada hubungan antara kadar kortisol dengan penurunan sementara ekspresi GR pada penderita resisten steroid (2,11,12). Kadar kortisol didapatkan menurun setelah pemberian terapi full dose steroid, dan meningkat mendekati kadar kortisol sebelum terapi steroid setelah 2 minggu pengobatan steroid dihentikan (11).

Hasil yang berbeda di dapatkan pada penelitian Haack (1999), Tago (2004) dan Quyang (2006) menunjukkan tidak ada perbedaan kadar kortisol antara kelompok SNRS dan SNSS (13,14). Perbedaan hasil penelitian untuk ekspresi GR kemungkinan disebabkan oleh perbedaan metode analisis ekspresi GR dan bahan/sampel yang diperiksa. Pada penelitian Bagasarova (1991) sampel yang diperiksa dengan metode *flowcytometri*, sedang pada penelitian Haack (1999) dan Tago (2004) menggunakan pengecatan *immunofluorescent* dengan pembacaan dengan mikroskop *fluorescent* dan Quyang (2006) selain menggunakan pengecatan *immunofluorescent*, penelitiannya juga menggunakan PCR (*polimerase chain reaction*) (2,12,14,21).

Reseptor glukokortikoid adalah anggota *superfamily* reseptor inti dari faktor transkripsi protein. Pada keadaan hormon steroid tidak ada di dalam sel, GR berada di sitoplasma dan terutama berikatan dengan Hsp-90 sebagai *chaperon* pada terminal karboksil. Selain dengan Hsp-90 GR juga berikatan dengan Hsp-70, *immunophilin p59* dan *phosphoprotein p23* membentuk suatu kompleks multiprotein yang lazim disebut GR-Hsp-90 kompleks. Lipatan kompleks molekul GR ini dijaga oleh 2 buah Hsp-90 dalam keadaan '*conformational state*', sehingga tetap siap berikatan dengan ikatan *high affinity* dengan hormon glukokortikoid saat hormon tersebut masuk ke dalam sitoplasma (18,22,23).

Heat shock protein-90 berperan penting dalam aktivasi GR. Pada keadaan '*conformational state*', GR masih dalam keadaan tidak aktif dan berada di sitoplasma. Hormon glukokortikoid yang masuk ke sitoplasma dan akan berikatan dengan kompleks GR-hsp90 kompleks. Bersamaan terjadinya ikatan dengan glukokortikoid, terjadi fosforilasi kompleks GR - Hsp-90 dan Hsp-90 kemudian lepas. Pelepasan Hsp-90 ini menghasilkan perubahan *conformational* yaitu terbukanya *nuclear location signal* (NLS). Hal ini menyebabkan GR menjadi aktif dan kemudian bertranslokasi ke nukleus, atau disebut juga aktivasi GR. Reseptor glukokortikoid di dalam nukleus kemudian merepresi gen-gen proinflamasi melalui beberapa mekanisme dasar : (i) berikatan dengan nGRE untuk menghambat transkripsi gen proinflamasi; (ii) secara fisik berinteraksi dengan p65 dari NF- κ B; (iii) secara fisik berinteraksi dengan sub-unit AP-1 untuk menghambat AP-1 mediated gen expression (18, 23, 24, 25).

Pada penelitian ini, ditunjukkan bahwa aktivasi GR tidak berbeda secara bermakna pada kelompok SNRS dan SNSS. Hal ini sesuai dengan penelitian Haack (1999), Tago (2004) dan Quyang (2006).

Temuan ini menunjukkan ada faktor lain selain ekspresi GR yang berperan terhadap resistensi steroid (13,14,21).

Heat shock protein-90 seperti yang telah dijelaskan diatas merupakan suatu *chaperon* yang penting untuk aktivasi GR, untuk itu penelitian ini juga ingin melihat peran Hsp-90 pada resistensi steroid. Hasil penelitian ini menunjukkan ekspresi Hsp-90 di nukleus dan sitoplasma berbeda bermakna, dimana pada SNRS Hsp90 di nukleus lebih tinggi dibanding dengan SNSS, dan ekspresi Hsp-90 di sitoplasma SNRS lebih rendah dibandingkan SNSS.

Hasil penelitian juga menunjukkan pada SNRS, ekspresi Hsp-90 di nukleus lebih tinggi dibanding SNSS, hal ini sesuai dengan penelitian Tago (2004) dan Quyang (2006). Menurut mereka ekspresi Hsp-90 di nukleus yang tinggi dapat mengganggu perpindahan GR dari nukleus ke dalam sitoplasma sehingga GR tertahan di nukleus. Hal ini akan menyebabkan GR akan berikatan kembali dengan Hsp-90, sehingga GR tidak dapat bekerja untuk menghambat pembentukan gen-gen proinflamasi (13,14).

Mekanisme untuk terjadinya Hsp-90 dapat masuk dan tertahan di nukleus belum jelas. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian Geldanamycin dapat menghambat fungsi Hsp90 sebagai *chaperon* dan menyebabkan retensi Hsp-90 di nukleus (7,26,27).

Penelitian Zhang (2006), yang meneliti resistensi steroid pada sel *glaucomatous trabecular meshwork* menyatakan dalam keadaan normal Hsp-90 tidak dapat bertranslokasi ke nukleus. *Over expression* GR β dapat menyebabkan kompleks Hsp-90 dan GR β dapat bertranslokasi ke nukleus seluruhnya. Kompleks Hsp90-GR β yang berada dalam nukleus dapat menyebabkan Hsp-90 tertahan di nukleus dan menyebabkan kerja GR menjadi terhambat (15).

Pada penelitian ini didapatkan pada kelompok SNRS, ekspresi Hsp90 pada sitoplasma lebih rendah dibandingkan pada kelompok SNSS. Hal ini berbeda dengan penelitian Tago (2004) dan Quyang (2006), dimana pada penelitian tersebut didapatkan hasil yang tidak berbeda bermakna untuk ekspresi Hsp90 di sitoplasma antara kelompok SNRS dan SNSS. Menurut mereka, *over expression* hsp90 di sitoplasma dapat menyebabkan GC-GR tidak bertranslokasi ke nukleus sehingga aktivitas GR untuk menghambat gen-gen proinflamasi menjadi terhambat. *Over expressi* Hsp-90 juga menyebabkan Hsp-90 dapat berpindah ke nukleus, yang selanjutnya di dalam nukleus Hsp-90 menghambat kerja GR dengan mengganggu ikatan GR dengan DNA respon elemen (13,14).

Pada analisis hubungan antara aktivasi GR dengan ekspresi Hsp-90 sitoplasma dengan menggunakan analisis korelasi Pearson, didapatkan hubungan tidak bermakna diantara kedua variable tersebut. Hal ini menunjukkan kemungkinan tidak hanya faktor Hsp-90 yang mempengaruhi aktivasi GR. Menurut Young (2001), *cochaperon* p23 dan Hsp-70 dapat mempengaruhi proses ikatan Hsp-90 pada gugus karboksil LBD (*Ligan Binding Domain*) (26).

Perbedaan hasil ekspresi Hsp-90 pada penelitian ini dengan penelitian terdahulu kemungkinan disebabkan oleh reaksi inflamasi yang sudah menurun karena pemberian terapi steroid jangka lama.

Menurut Nollen dan Morimoto (2002), sintesis Hsp-90 di dalam sel meningkat sesuai dengan tingkat kondisi *stress* atau reaksi inflamasi yang terjadi pada sel (28). Pada penelitian ini sampel darah yang diambil adalah pada saat sesudah ditegakkan diagnosis SNRS dan SNSS dan tidak melihat lama pengobatan serta jenis obat yang telah digunakan oleh penderita.

Pada Bagian Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit Saiful Anwar, terapi siklofosamid digunakan untuk sindrom nefrotik relaps sering dan resisten steroid. Penelitian Gulati, *et al.* (2001) menunjukkan siklofosamid lebih efektif dan aman untuk sindrom nefrotik idiopatik dengan relaps sering (29). Jha, *et al.* (2007) menunjukkan terapi siklofosamid lebih efektif dibandingkan steroid pada penderita sindrom nefrotik (30).

Pengambilan sampel dengan metode *cross sectional* pada penelitian ini dapat mempengaruhi hasil penelitian. Hal ini sangat berpengaruh terutama pada kelompok SNRS yang telah mendapat terapi glukokortikoid jangka panjang dan atau siklofosamid yang pada keadaan demikian mungkin saja saat diambil sampel darah reaksi inflamasi yang terjadi sudah tidak seberat sebelumnya, selain itu pemakaian steroid jangka panjang kemungkinan dapat mempengaruhi kadar kortisol pada darah penderita.

Penelitian ini memiliki keterbatasan pada teknik analisis yang menggunakan metode *double staining* imunositokimia dan pengamatan yang menggunakan mikroskop cahaya yang sensitifitasnya lebih rendah dibandingkan dengan pengecatan *fluorescent* dengan pengamatan dengan mikroskop *fluorecent* atau dengan menggunakan pemeriksaan PCR. Keterbatasan lain dari penelitian ini adalah tidak diukurnya kadar kortisol penderita yang menjadi sampel penelitian pada awal diagnosis sindrom nefrotik idiopatik dan setelah ditegakkan diagnosis SNRS dan SNSS.

KESIMPULAN

Dari penelitian didapatkan perbedaan yang bermakna ekspresi GR antara kelompok SNRS dan SNSS, dimana ekspresi GR pada kelompok SNRS lebih rendah ; tidak didapatkan perbedaan yang bermakna pada aktivasi GR antara kelompok SNRS dan SNSS ; didapatkan perbedaan yang bermakna ekspresi Hsp-90 di sitoplasma antara kelompok SNRS dan SNSS, dimana ekspresi yang lebih rendah didapatkan pada kelompok SNRS ; didapatkan perbedaan yang bermakna ekspresi Hsp-90 di nukleus antara kelompok SNRS dan SNSS, dimana ekspresi Hsp-90 yang lebih rendah didapatkan pada kelompok SNRS ;tidak didapatkan hubungan antara aktivasi GR dengan ekspresi Hsp-90. Ekspresi GR terbukti berperan dalam terjadinya resistensi steroid pada Sindroma Nefrotik. Rendahnya ekspresi GR

Hsp-90 sitoplasma yang berfungsi sebagai *chaperon* yang berfungsi mempertahankan bentuk molekul GR.

DAFTAR PUSTAKA

1. Orth SR, Eberhard R. *The nephrotic syndromes*. *NEJM*.1998; 338 : 1202-11.
2. Bagdasarova IV, Ivanov DD, Afanas'eva VV. *The morphofunctional characteristics of the blood lymphocytes in steroid sensitive and steroid resistant glomerulonephritis*. *Arkh Pathol*. 1991; 53, 28-32.
3. Rio MD, Frederick K. *Evaluation and management of steroidunresponsivenephrotic syndrome current opinion in pediatrics*. *NEJM*.2008; 20:151-6.
4. Bagga A, Mantan M. *Neprotic Syndrome in Children*. *Indian J Med Resp*.2005; 122: 13-28.
5. Alatas H, Taralan T, Partini PT, Sudung OP. *Konsensus Tatalaksana Sindrom Nefrotik Pada Anak*. Ikatan Dokter Anak Indonesia.Jakarta. 2005
6. Lee KW, Mak R. *Update Review of Therapeutic Regimens for Steroid Resistant Idiopathic Nephrotic Syndrome*. *HK J Paediatr*. 2000; 5: 70-5.
7. Grenert JP, Sullivan WP, Fadden P, et al. *The amino-terminal domain heat shock protein 90 (hsp90) that bind geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates Hsp90 conformation*. *J Bio Chem*.1997; 272: 23843-5
8. Yu Z, Ding J, Huang J, Yao Y, et al. *Mutations in NPHS2 in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children*. *Nephrol Dial Transplant*.2005; 20: 9028.
9. Karle SM, Uetz B, Ronner V, Glaeser L, Hildebrandt F, Fuchshuber A. *Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome*. *J Am Soc Nephrol*.2002; 13: 38893.
10. Kang K I, Xia M, Jocelyn DL, Ilham B, et al. *The molecular chaperone hsp-90 can negative regulate of a glucocorticosteroid dependent promoter*. *Proc Natl Acad Sci USA*.1999; 95: 1439-44.
11. Wasilewska A, Walentyna ZB, Tomaszewska, Ryszard W, Anna SB. *Expression of glucocorticoid receptors in mononuclear cells in nephritic syndrome*. *Pediatr nephrol*. 2003;18: 778-82
12. Berki T, Nagy KK, Nagy G, Nemeth P. *Alteration of glukokortikoid hormone therapy in remathoid arthritis*. *Arthritis Rheum* . 2002; 35:132-38
13. Tago K, Fujiko T, Mitsuhide N, Toshimasa Y, Kazue T. *Regulation of nuclear retention of glucocorticoid receptor by Hsp90*. *Mol and cell Endocrinol*. 2004; 213: 131-8
14. Quyang J, Tang J, Min T, Yin C, Xiaoyan L. *Abnormal expression and distribution heat stroke protein 90: potential etiologic immunoendocrine mechanism of glucocorticoid resistance in idiopathic nephritic syndrome*. *J neprol Dial*. 2006; 34: 496-500.
15. Zhang X, Abbot FG, Thomas V. *Heat shock protein is essential molecular chaperone for nuclear transport of glucocorticoid receptor*. *IOVS*. 2006; 47: 700-8.
16. Hodson EM, Habashy D, Craig JC. *Intervention for idiopathic steroidresitant nephritic syndrome In children*. *The Cochrane Review Journal*. 2007; 6: 267-72.
17. Hodson EM, John FK, Narelle SW, Jonathan CC. *Corticosteroid therapy in nephritic syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *Arch Dis Child*. 2000; 83: 45-51.
18. Nicela BM, Cidlowski A. *Mechanisms of glucocorticoid Receptor action in noninflammatory and inflammatory cells*. *Proc Am Thorac Soc*. 2004; 1: 239-46.
19. Burnstein KL, Cidlowski JA. *The Downside of glucocorticoid receptor regulation*. *Moll Cell Endocrinol*. 1992; 8: C61-C68.
20. Han SH, Park SY, Li J, Kwak SJ, Jung DS, Choi HY. *Glomerular glucocorticoid receptor expression is reduced in late responders to steroids in adult-onset minimal change disease*. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23: 169175.
21. Haack D, Schrer K, Taucher A, Vesse P. *Glucocorticoid receptors in idiopathic nephritic syndrome*. *Pediatr Nephrol*.1999; 13: 653-56.
22. Carrigan A, Walther RF, Salem HA, Wu D, Atlas E, Lefebvre YA. *An Active Nuclear Retention Signal in the Glucocorticoid Receptor Functions as a Strong Inducer of Transcriptional Activation*. *The Jour Of Biol Chem*. 2007; 282(15) : 1096371
23. Charmandari E, George PC, Takamasa I, et al. *The human glucocorticoid Receptor (hGR) isoform suppresses the transcriptional activity of hGR by interfering with formation of active coactivator complexe*. *Mol Endocrinol*. 2005; 19: 52-64.
24. Elbi C, Dawn AW, Guillermo R, et al. *Molecular Chaperons function as steroid receptor nuclear mobility factors*. *PNAS* . 2004; 101: 2877-881.
25. Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA. *Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance*. *Mol & Cell Endocrinol*. 2008; 300: 716.
26. Young JC, Muorefi I, Hard FU. *Hsp90 : a specialized but essential protein-folding tool*. *J cell Biology*.2001; 152(2): 267-73.
27. Czar MJ, Galigniana MD, Silvetstein AM, Pratt WB.. *Geldanamycin, heat shock protein 90-binding benzoquinone ansamycin, inhibits steroid-dependent translocation of glucocorticoid receptor from the cytoplasm to nucleus*. *Biochem*. 1997; 36: 7776-85.
28. Nollen AAE, Morimoto RI. *Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins*. *J of Cell Scie*.

2002;115:2809-16

29. Gulati S, Pokharial S, Sharma RK, *et al.* *Pulse cyclophosphamide therapy in frequently relapsing nephritic syndrome.* Nephrol Dial Transplant.2005;16:2013-2017.
30. Jha V, Ganguli A, Saha TK,*et al.* *A randomized, controlled trial of steroids and cyclophosphamide in adults with nephrotic syndrome caused by idiopathic membranous nephropathy.* J Am Soc Nephro . 2007; 18: 1899-1904.