



**T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**İNSAN PODOSİTOPATİLERİ GRUBUNDA SIK
RASTLANAN BAZI HASTALIKLARDA SLİT DİAFRAM
PROTEİNLERİNİN LOKALİZASYONLARININ VE
EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ VE
FİLTASYON BARIYERİNİN ULTRASTRÜKTÜREL
DÜZEYDE İNCELENMESİ**

**Dr. Mustafa YILMAZ
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Banu COŞKUN YILMAZ**

MERSİN-2013

**T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**İNSAN PODOSİTOPATİLERİ GRUBUNDA SIK
RASTLANAN BAZI HASTALIKLARDA SLİT DİAFRAM
PROTEİNLERİNİN LOKALİZASYONLARININ VE
EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ VE
FİLTRASYON BARIYERİNİN ULTRASTRÜKTÜREL
DÜZEYDE İNCELENMESİ**

**Dr. Mustafa YILMAZ
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Banu COŞKUN YILMAZ**

**Bu Tez, BAP-TF TTB (MY) 2012-5 TU kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir.**

MERSİN-2013

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince beni daima destekleyen eşim, oğlum ve kızıma, tez çalışmama katkı sağlayan değerli hocalarım Doç.Dr. İclal Gürses, Prof. Dr. Ahmet Kıykım ve Prof. Dr. Ali Delibaş'a, tezimin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimim sırasında bilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Banu Coşkun Yılmaz'a, uzmanlık eğitimim sırasındaki katkı, destek, yardım ve hoşgörülerini için hocalarım Prof. Dr. Tülin Baykal, Doç. Dr. ř. Necat Yılmaz, Doç. Dr. Ebru Ballı ve Yrd. Doç. Dr. Savaş Aktaş'a, tezimin teknik kısmında yardımcı olan Lab. Tek. İsmail Arıkuşu'na ve birlikte çalıştığım arkadaşlarıma en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Mustafa YILMAZ

Mersin 2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	7
GİRİŞ VE AMAÇ	9
GENEL BİLGİLER	11
Glomerüler Endotel Hücreler	11
Glomerüler Bazal Membran	12
Podositler	13
Podositin Farklılaşması	14
Podosit Fonksiyonu ve Yapısına Genel Bakış	15
Slit Diafram	18
Slit Diafram ve Aktin	19
Podositte aktin oluşumu nasıl düzenlenir?	20
Slit Diafram Proteinleri	20
Nefrin	20
Podosin	23
CD2 İlişkili Protein	24
P-Kaderin	24
Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	25
Komşu Hücreler ve Podositler Arasında Haberleşmenin Önemi	25
Podosit-GBM Arayüzü	25
Glomerüler Filtrasyon Bariyerinde Sıvı Akışının Düzenlenmesi	26
Proteinüri	26
Silinme ve Proteinüri Patogenezi	28
İnce Yapı(ultrastruktürel) Değişikliği-Proteinüri İlişkisi	30
Aktin Dinamikleri ve Tamir Süreci	31
Glomerüloskleroz Mekanizmaları	32
Podositopatilerin Sınıflandırılması	33

Minimal Değişiklik Hastalığı	33
Membranoproliferatif (Mezangiokapiller) Glomerülonefrit	34
Fokal Segmental Glomerüloskleroz	35
Membranöz Nefropati	37
GEREÇ ve YÖNTEMLER	39
İmmunelektron Mikroskopi Protokolü	40
BULGULAR	43
TEM ile Tesbit Edilen Morfolojik Bulgular	43
Kontrol Grubu	43
Minimal Değişiklik Hastalığı Grubu	44
Membranöz Glomerülonefrit Grubu	45
Membranoproliferatif Glomerülonefrit Grubu	46
Fokal Segmental Glomerüloskleroz Grubu	49
İmmunelektron Mikroskopik Ekspresyon(İEM) Bulgular	50
Nefrin IEM Ekspresyon Bulguları	50
Aktin IEM Ekspresyon Bulguları	56
CD2AP IEM Ekspresyon Bulguları	60
P-kaderin IEM Ekspresyon Bulguları	65
Podosin (NPHS2) IEM Ekspresyon Bulguları	69
TARTIŞMA	74
SONUÇ ve ÖNERİLER	89
KAYNAKLAR	91
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	102
TABLolar DİZİNİ	103
ŞEKİLLER DİZİNİ	104
RESİMLER DİZİNİ	105

ÖZET

Böbrekte filtrasyon işleminin sürekli ve sağlıklı şekilde sürdürülmesi, glomerüler filtrasyon bariyerinin yapısının korunmasıyla mümkündür. Bu bariyerin bozulmasıyla glomerüler hastalıklar oluşur. Podosit zedelenmesi ve slit diafram proteinlerindeki değişiklikler, glomerüler hastalıkların tanısında, hastalığın aktivitesi ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde faydalı olabilmektedir. Podositlerin ve slit diaframın, proteinürilerdeki önemi bilinmekle birlikte, bu etkinin hangi mekanizmalar üzerinden yürüdüğü açıklığa kavuşmamıştır. Ayrıca, farklı glomerülopatilerde slit diafram proteinlerinin ekspresyonlarında değişiklik olup olmadığı konusunda farklı sonuçlarla karşılaşmıştır.

Biz çalışmamızda insan podositopatileri grubunda, slit diafram proteinlerindeki (nefrin, podosin, CD2AP, aktin, p-kaderin) değişiklikleri belirlemeyi ve podositlerdeki ve filtrasyon bariyeri yapısındaki morfolojik değişiklikleri elektron mikroskopik düzeyde kaydetmeyi amaçladık. Araştırmada Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji kliniğine 2005-2011 yılları arasında başvuran ve iğne biyopsisi alınarak incelenmek üzere Histoloji ve Embriyoloji AD Elektron Mikroskopi laboratuvarına gönderilen bloklanmış hasta böbrek dokularını kullandık. Membranöz Glomerülonefrit, Minimal Değişiklik Hastalığı, Membranoproliferatif Glomerülonefrit ve Fokal Segmental Glomerüloskleroz klinik tanılı hastalardan beşer hasta içeren dört grup oluşturduk. Kontrol grubu olarak 2005-2011 yılları arası başvuran, glomerüler hasarı bulunmayan tubulointerstisyel nefrit tanısı almış dört hastanın bloklanmış dokularını kullandık. Hastaların biyopsi materyallerini ultrastrüktürel olarak morfolojik düzeyde inceledik. Ayrıca anti-nefrin, CD2AP, podosin, aktin ve p-kaderin antikoları ile immünelektron mikroskopik işaretleme yaptık.

Morfolojik inceleme sonucunda, pedisel düzleşmesinin yoğun olduğu alanlarda her hastalık grubunda farklı bir aktin yoğunlaşması paterni gördük. Aktinin primer patolojinin lokalizasyonuna göre farklı şekilde yoğunlaştığını ve yer yer patolojik bölgeyi sınırlamayı hedeflediğini düşündük. Podositte filtrasyon

yarığı ve slit diafram yapılarının farklı hastalık gruplarında değişkenlik gösterdiğini izledik.

İmmünelektron mikroskobik işaretlemelelerde, nefrin ekspresyonunun incelediğimiz tüm hasta gruplarında kontrole göre azaldığını gördük, en iyi işaretleme için minimal değişiklik hastalığı grubunda gördük. Aktin ekspresyonunun hasta gruplarının hepsinde kontrole göre arttığını gördük. CD2AP'nin membranoproliferatif glomerülonefrit hasta grubunda kontrole en yakın ekspresyonu gösterdiğini, diğer gruplarda ekspresyonun azaldığını gördük. P-kaderin ekspresyonunun da tüm hasta gruplarında azaldığını gördük. Podosin minimal değişiklik hastalığında kontrol grubu kadar eksprese olurken diğer hasta gruplarında ekspresyonun azaldığını gördük.

Proteinürinin oluşmasında, slit diafram yapısındaki moleküler değişikliklerin esas belirleyici olduğunu düşündük. Slit diafram yapısı iyiyse, proteinlerin ekspresyonlarının da iyi düzeyde olduğu ve aynı oranda tedaviye yanıtın da iyi olduğu kanısına vardık. Bu proteinlerin takibinin, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde yardımcı olabileceği sonucuna vardık.

Anahtar kelimeler: Podosit, Filtrasyon Yarığı, Slit Diafram, Nefrin, CD2AP, Podosin, Aktin, P-Kaderin

ABSTRACT

A constant and healthy working renal filtration process relies on the protection of glomerular filtration barrier. Distruption of this barrier can cause to glomerular diseases. Observation of podosit damage and alternations in slit diaphragm proteins can be beneficial for evaluating the disease activation and treatment response in the diagnosis of glomerular diseases. Despite the knowledge of importance of podocytes and slit diaphragm proteins on the proteinuria, the underlying mechanisms are still not known. Besides, the related literature is not agreed on the expression behaviour of slit diaphragm proteins at glomerulopathies.

In our study, its aimed to study the alternations of slit diaphragm proteins (nephrin, CD2AP, podocin, actin and p-cadherin) as well as morphological changes in the podocytes and filtration barrier via electron microscopy. At this study, we used the renal tissue blocks prepared from the needle biopsy specimens of the patients who applied to the Nephrology Clinics of the Internal Diseases Department of Mersin University Education and Research Hospital during 2005-2011. We formed four different disease groups (n=5 for each group) of those tissue specimens of the patients who diagnosed with membranous glomerulonephritis, minimal change disease, membranoproliferative glomerulonephritis and focal segmental glomerulosclerosis. As the control group, we used the kidney samples of the patients registered during 2005-2011 who had no glomerular damage but diagnosed with tubulointerstitial nephritis.

We examined tissues ultrastructurally for morphological evaluation. Plus, we carried out immunoelectron microscopic staining by using nephrin, CD2AP, podocin, actin and p-cadherin antibodies. By using immuno-electrone microscopic staining, each antibody used in the study showed different expression profile.

Upon the morphological evaluation, it is seen that each disease group exhibited a different actin density at the effacement foot process areas. More elaborately, actin density was observed to be dependent on the localization of the primary pathology of disease. At some areas, this density was postulated to restrict the pathological territory. Filtration slit and slit diaphragm formations in the podocytes were seen to be differential depending on the disease groups.

By immunoelectron microscopic staining, nephrin expression was reduced at all the disease groups as compared to the controls and the minimal change disease group was stained at the highest quality among all the tissues. Also, actin expression was higher than the controls of all the groups. CD2AP was almost equal to the controls at the membranoproliferative glomerulonephritis group while decreased at the rest of the groups. P-cadherin expression was reduced at all the disease tissues. Additionally, podocin expression was not different at minimal change disease while decreased at the other tissues comparing to controls.

As a result, we postulate that molecular changes in the slit diaphragm formation are the main determinant of the proteinuria. Moreover, if the slit diaphragm formation is good, protein expressions and treatment response are observed to be better. To sum up, we suggest that above mentioned proteins could be used as markers for evaluating the treatment response.

Keywords: Podocyte, Filtration slit, Slit diaphragm, Nephrin, CD2AP, Podocin, Actin, P-cadherin

GİRİŞ VE AMAÇ

Her bir böbrek, içerdği yaklaşık bir milyon glomerül sayesinde, suda çözünen plazma artık ürünlerini glomerüler filtrasyon yolu ile elimine eder. Ancak böbreğe kan akımı yoluyla gelen her molekül ultrafiltrat olarak atılmaz. Makromoleküller ve albuminin atılımı glomerüler filtrasyon bariyeri tarafından engellenir. Filtrasyon işleminin sürekli ve sağlıklı şekilde sürdürülmesi, filtrasyon bariyerinin yapısının korunmasıyla mümkündür. Glomerüler filtrasyon bariyerinin bozulması sonucunda glomerüler hastalıklar oluşur. Glomerüler hastalıklar böbrek hastalıkları içinde önemli yer tutmaktadır. Minimal değişiklik hastalığı (MDH), fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS), membranöz glomerülonefrit ve mezangioproliferatif glomerülonefrit podositopatiler grubunda oldukça sık rastlanan hastalıklardandır.

Glomerüler filtrasyon bariyerinin en önemli elemanları arasında podositler ve onların ayaksı uzantıları (pedisel) arasında yer alan slit diafram(SD) adı verilen membranlar bulunur. Elektron mikroskopi tekniklerinin gelişmesi ve slit diaframın seçici geçirgenlikteki önemini anlaşılmaya başlamasıyla bu yapıdaki morfolojik değişikliklerin ve slit diaframı oluşturan moleküllerin saptanması aşaması başlamıştır. Bu amaçla slit diafram ile ilişkili çok sayıda protein tanımlanmıştır. Bunlardan ilk tanımlananı nefrin dir. Yapılan bazı çalışmalarda, proteinüri ile seyreden böbrek hastalıklarında, pedisel düzleşmesi olan bölgelerde nefrin ekspresyonunun kontrollere göre azaldığı belirlenmiştir^{1,2} Bunun yanısıra, slit membranda lokalize olan podosin, CD2AP, P-kaderin, Neph 1 ve 2, FAT 1 ve 2, ZO-1 gibi çok sayıda protein bulunmaktadır.

Podositlerin ve slit diaframın, proteinürilerdeki önemi bilinmekle birlikte, bu etkinin hangi mekanizmalar üzerinden yürüdüğü açıklığa kavuşmamıştır. Ayrıca, farklı glomerülopati durumlarında slit diafram proteinlerinin ekspresyonlarında değişiklik olup olmadığı konusunda farklı sonuçlarla karşılaşmıştır. Biz çalışmamızda; insan podositopatileri grubunda sık rastlanan bazı hastalıklarda slit diafram proteinlerindeki (nefrin, podosin, CD2AP, aktin ve p-kaderin) değişiklikleri belirlemeyi, podositlerdeki ve filtrasyon bariyeri yapısındaki morfolojik değişiklikleri kaydetmeyi amaçladık. Bu değerlendirmeleri

elektron mikroskopik düzeyde gerçekleştirmeyi hedefledik. Elde edilecek bilgilerin; proteinüri ile seyreden glomerülopatilerin mekanizmalarının belirlenebilmesine yardımcı olabileceği, ve glomerüler hastalıkların tanısında, diğer hastalıklar ile aralarında ilişki ve benzerlik kurulmasında ve tedavi planının oluşturulmasında yararlı olabileceği düşünölmektedir.

GENEL BİLGİLER

Nefron, böbreğin fonksiyonel birimidir, bir glomerülden ve renal tübül sisteminden meydana gelir. Glomerül, Bowman kapsülü tarafından çevrili bir kapiller halka ağıdır ve kanın filtrasyonunun ilk adımını yürütür. Glomerül, Bowman kapsülü içerisinde lokalize anastomozlaşmış kapillerlerin bir demetidir. Glomerüler kapiller duvar, filtrasyon fonksiyonuna imkan veren kompleks bir morfolojiye sahiptir. Glomerüler kapiller duvar yapısı çok yönlü bir filtredir; albumin ve daha büyük moleküllerin filtre olmasına engel olurken, suyun ve küçük plazma çözünenlerinin hızla idrar boşluğuna geçişine izin verir.

Filtrasyon bariyerinde moleküllerin hareketinin boyuta, şekle ve yüke göre belirlendiği sanılmaktadır.

Glomerül üç yerleşik hücre tipinden oluşur: podositler diye de bilinen visseral epitel hücreleri, glomerüler endotel hücreleri ve mezangiyal hücreler.³

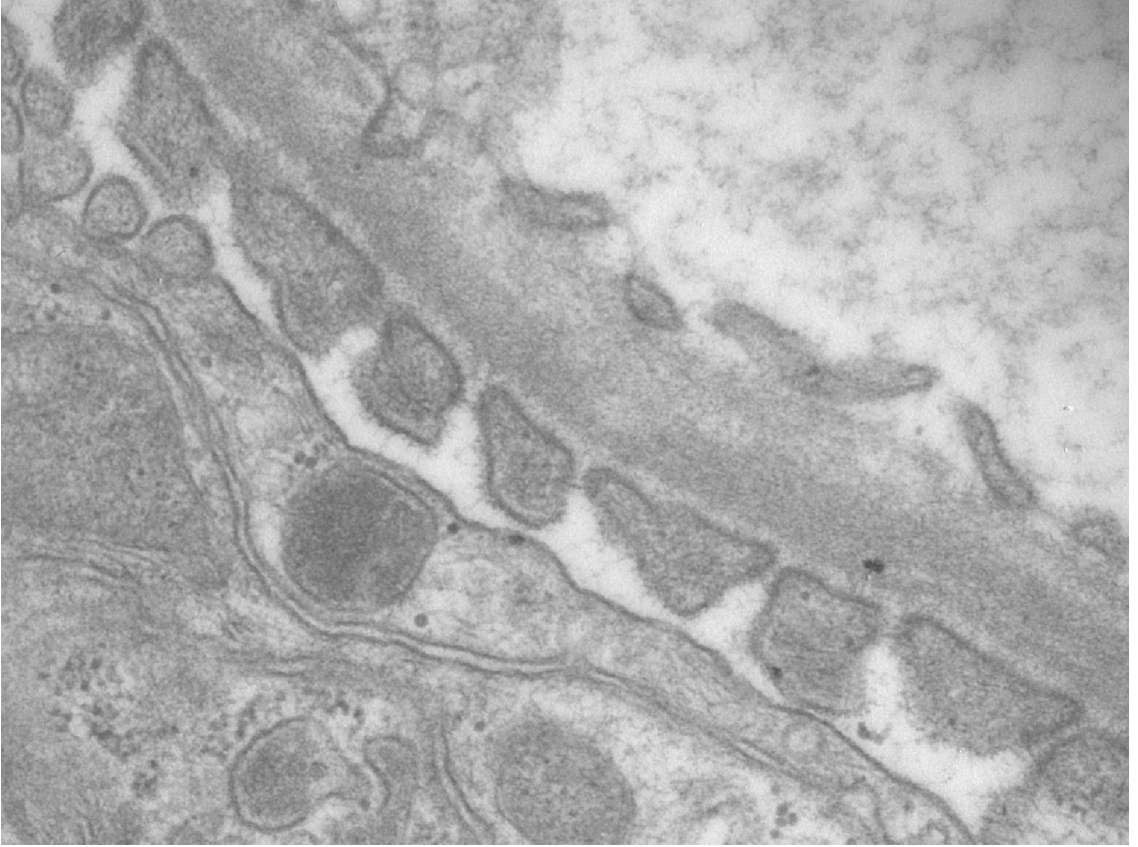
Filtrasyon bariyeri, bu hücrelerden ilk ikisinin oluşturduğu üç tabaka içerir: fenestralı endotel hücreleri, glomerüler bazal membran (GBM), ve en dışta podosit ayakları uzantılarını birbirine bağlayan slit diaframları.

Glomerüler Endotel Hücreler

Glomerüler kapillerlerin içi son derece özelleşmiş endotel hücreleriyle kaplıdır (Resim 1). Podositlerden ve mezangiyumdan gelen vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) içeren sinyaller, endotele fenestralı bir fenotip kazandırır.⁴ Bu fenestralar endotel yüzeyinin %20'sini kaplar, sıvı ve küçük solütlerin filtrasyonunu kolaylaştırır.

Filtrasyon yolunun ekstrasellüler olduğu düşünülmektedir, filtrat endotel fenestrası sayesinde önce glomerüler bazal membran (GBM) sonra da podosit ayakları arasında lokalize filtrasyon sliti sayesinde idrar boşluğuna geçer. Filtrasyonda glomerüler endotel hücrelerinin rolü çok iyi anlaşılammıştır. Olgun endotel hücrelerinde fenestraların diaframları bulunmadığından, plazma makromolekülleri için ancak bir bariyer gibi görev yapabilir.⁵ Endotel hücreleri, etkin şekilde glikokaliks ve bazal membran sentezlerler. Glomerüler endotel

hücrelerinin yüzeyi negatif yüklü glikokaliks sahiptir, bu tabaka filtrasyon bariyerinin, filtre edilen moleküllerin taşıdığı elektriksel yüke göre seçici davranmasına katkıda bulunabilir.⁶ Bu glikokaliks 100-300 nm kalınlıkta proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar, glikolipidler ve tutulmuş proteinlerle ilişkili bir membran tabakasıdır. Albumin filtrasyonunun önlenmesinde endotel hücrelerini örten glikokaliksin önemli rolü olduğu fikri, yakın zaman önce hyaluronidaz enzimi ile endotel yüzeyinin bozulmasının, albuminüriyle sonuçlanmasıyla doğrulanmıştır.⁷



Resim 1: Glomerüler endotel fenestraları, altında GBM, daha altta podosit ayakları uzantıları ve aralarında slit diaframlar

Glomerüler Bazal Membran

Filtrasyon bariyerinde orta tabaka GBM'den oluşur, ona podositler ve endotel hücreleri tutunur. GBM tipik bir bazal membran gibi incelenebilir: ince yapı düzeyinde incelendiğinde elektron dens bir lamina densaya sahiptir, endotel hücresi ve podositle arasında lamina rara interna ve eksterna bulunur.

GBM bazı atipik bağlanmalara da sahiptir, diğer bazal membranlarla kıyaslandığında kalın olduğu görülür; çünkü glomerülogenez boyunca iki farklı bazal membranın, endotel ve podosit bazal membranlarının birleşmesiyle oluşmuştur.⁸ GBM diğer bazal membranların çoğuyla kıyaslandığında özel bir kompozisyona sahiptir, ve bu durum ona eşsiz fonksiyonel özellikler kazandırır.

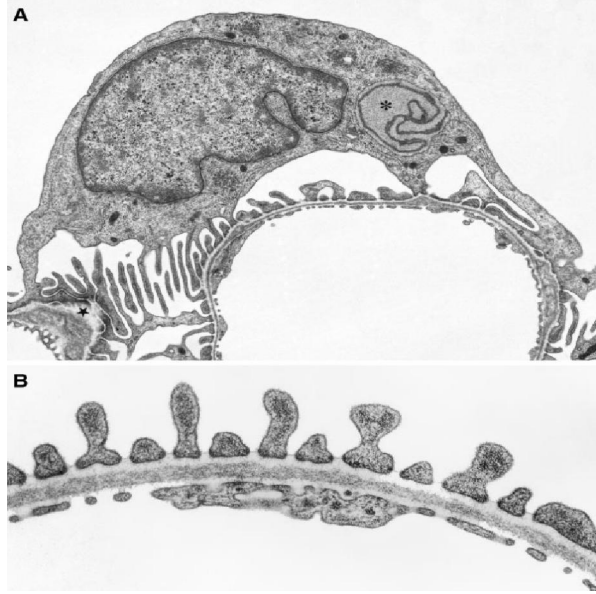
GBM başlıca laminin ve tip IV kollajen polimerlerinden oluşur.⁹ Bu bileşim glomerüler gelişim boyunca değişir.¹⁰ Başlangıçta hem endotel hücreleri hem de podositler laminin $\alpha1\beta1$ üretirler, sonra gelişim boyunca laminin replasmanı meydana gelir, aynı hücrelerin $\alpha5\beta2$ laminin üretmesi sonucunda kalıcı laminin formu oluşur.¹¹ Kollajen $\alpha1\alpha2\alpha1$ (IV) ağı ilk olarak fetal gelişim boyunca endotel hücreleri tarafından üretilir.¹¹ Bu ağın yerini daha sonra, sadece podosit tarafından üretilen $\alpha3\alpha4\alpha5$ ağı alır. Bu ağın yokluğu Alport Sendromu gibi bazı böbrek hastalıklarıyla sonuçlanır.¹⁰

Glomerüler filtrasyon bariyeri, plazma makromoleküllerinin boyut, biçim ve yüküne göre geçişlerini kısıtlayan seçici bir filtre gibi davranır.^{12,13} Negatif yüklü moleküller nötral moleküllerden daha az miktarda filtre edilir, pozitif yüklü moleküllerin geçişi ise daha kolaydır. GBM, tip IV kollajen, laminin, nidojen ve proteoglikanlarla sıkıca çapraz bağlanmış moleküler bir iskeletten oluşmuştur.^{14,15} Bazal membrana spesifik heparan sülfat, proteoglikanlar perlekan¹⁶ ve agrin¹⁷ GBM'nin bileşenleridir. Tip IV kollajen ve laminin GBM'a destek sağlar, podositlerin ve endotel hücrelerinin adezyonunda rol oynayabilir. GBM'nin büyük plazma proteinlerinin karşı yöne geçişini kısıtladığı kabul edilir.^{18,19}

Podositler

Glomerüler kapiller duvarın en dıştaki tabakasını podositler oluşturur. Podositler glomerüler visseral epitel hücresi diye de bilinirler. Eşsiz bir anatomik yapıya sahip olan podositler, Bowman aralığı içine otururlar ve böylece primer filtratla yıkanır. Podosit hücre gövdesi üriner boşlukta yüzer. Podositler; filtrasyon bariyerinin korunması, glomerüler filtrasyonun düzenlenmesi, kapiller yumağın desteklenmesi, GBM yapımı ve yıkımı ile immunolojik fonksiyonları kapsayan çeşitli glomerüler fonksiyonlarda görevlidir.²⁰ Glomerüler kapillerler,

bitişik podositlerin ayaklı uzantılarının kenetlenmesiyle dışarıdan sarılırlar.²¹ Podosit hücre gövdesinden çıkan ve primer (major) uzantılar olarak isimlendirilen hücre uzantıları genişleyerek kapiller halkaya doğru uzanırlar. GBM yüzeyinde bu uzantılar daha fazla bölünür, oluşan terminal ayaklı uzantılar kenetlenmeler yaparak GBM'nin dış yüzünü örter (Resim 2)²². Ayaklı uzantılar integrinler ve distroglikanlar aracılığıyla GBM ile bağlantılıdır.²²



Resim 2: ²² Podosit hücre gövdesinden çıkan hücre uzantıları primer uzantılar, bu uzantılar daha fazla bölünür GBM'nin dış yüzünü örten terminal ayaklı uzantıları oluşturur.

Podositin Farklılaşması

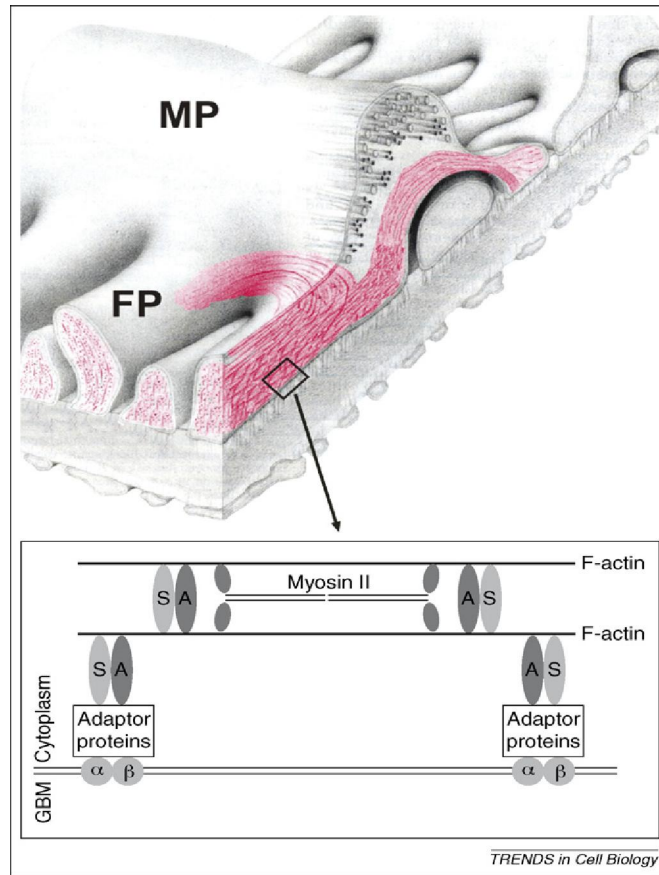
Glomerüler gelişim dört evreye ayrılır;

- Renal vezikül evresi,
- S-benzeri yapı evresi,
- Kapiller halka evresi,
- Olgun glomerül evresi.²³

S benzeri yapı evresinden kapiller halka evresine ilerleme podositlerin farklılaşmasında kritiktir.^{3,24} Bu geçiş sırasında, olgunlaşmamış podositler mitotik aktivitelerini kaybederler, eşsiz ve kompleks hücre yapıları kurulmaya başlar, ayaklı uzantıları belirginleşir ve hücre-hücre bağlantılarının kurulmasıyla slit diafram oluşur.²⁵ Olgun podositte hem epitelyal özellikler (apikal ve bazal yüzde hücre polaritesi belirlenmiştir), hem de mezanşimal özellikler (bir ara filaman proteini olan vimentinin de novo ekspresyonu, desmozomal proteinler ve E-kaderin gibi epitelyal markerlerin kaybı ve parsiyel motilite) mevcuttur.²⁵

Podosit Fonksiyonu ve Yapısına Genel Bakış

Podositler, bariyer fonksiyonu ve normal kapiller yapıyı devam ettirmede mekanik duyarlı hücreler olarak görev yaparlar.²⁶ Tamamen farklı bir podosit; üriner boşlukta lokalize ve zengin bir hücre iskeleti ağına sahip bir hücre gövdesinden, major uzantılardan, major uzantıların dallanmasıyla oluşan ayaklı uzantılardan ve kendisini GBM'na bağlayan bazı integrinler ile α ve β distroglikanlardan oluşur (Şekil 1).^{3,27,28}

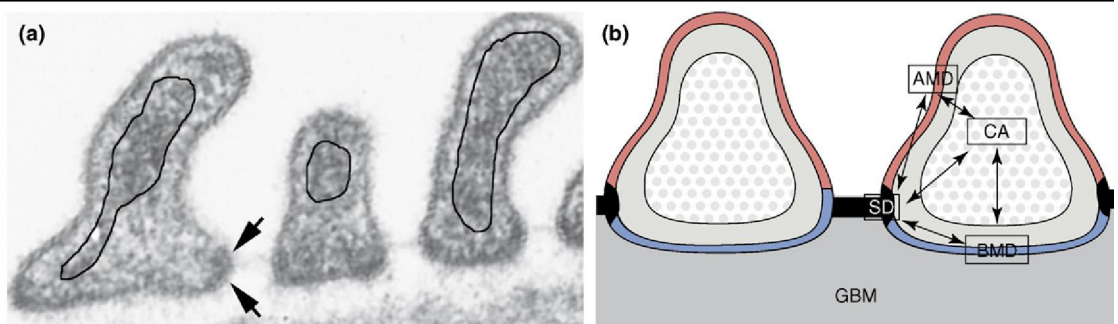


Şekil 1:²⁸ Major uzantılar(MP) mikrotübüller ve ara filamanlar içerirler. Komşu ayaklı uzantılar(FP) F-aktin, miyosin II, alfa aktinin-4 (A) ve sinoptopodin(S) içeren kontraktıl aygıtlarla bağlıdır. Adaptör proteinler α (a) ve β (b) integrin tarafından GBM'na bağlanırlar.

Podosit hücre gövdesi, nükleus, Golgi aygıtı, endoplazmik retikulum ve mitokondriyon gibi hücre organelleri içerir. Major uzantıların esas parçası, mikrotübüller ve vimentin ara filamanlarından oluşur (Şekil 1)²⁸. Podosit ayaklı uzantıları, komşu podositlerin ayaklı uzantılarıyla karakteristik ve spesifik bir

şekilde kenetlenir. Bu kenetlenme bölgeleri, slit diaframın köprüleşmesiyle oluşmuş modifiye bir bağlantı kompleksidir.^{3,25,29}

Podosit ayakası uzantılarında organel bulunmaz. Burada bulunan hücre iskeleti, son derece organize paralel ve kontraktıl aktin filaman demetlerinden meydana gelir (Şekil 1)²⁸. Podosit ayakası uzantıları içinde yer alan hücre iskeletinin dinamik olarak düzenlenmesi, podositin fonksiyonunu tam olarak gerçekleştirebilmesi için önemlidir. Ayaksı uzantılar fonksiyonel olarak apikal membran bölgesi, slit diafram bölgesi ve bazal membran bölgesi olmak üzere üç farklı membran bölgesi halinde incelenebilir (Şekil 2)²⁸. Bu membran bölgeleri, podositin hücre içi dinamiklerinden sorumlu özelleşmiş proteinler içerir.^{25,30} Bu bölgeler birbirine ve kontraktıl yapıya aktin iskeletle bağlıdır.²⁵ Bu membran bölgelerinin ve onların özelleşmiş proteinlerinin fonksiyon ve ekspresyonlarında her çeşit bozulma, aktinde yeniden düzenlenmeye yol açar. Ayaksı uzantı yapılarının kaybı, ayaksı uzantı silinmesi diye bilinir ve proteinüriye işaret eder.^{25,31}



Şekil 2:²⁸ Solda TEM fotoğrafında ayaksı uzantıların merkezinde kontraktıl aktin demetler siyah çizgiyle çevrilmiş, SD'nin sitoplazmik tutunma yerinde elektron dens materyal siyah oklarla gösterilmiştir. Sağda şematik resimde podosit ayakası uzantılarında üç membran bölgesi tanımlanmıştır; apikal (AMD kırmızı), bazal (BMD mavi) ve SD bölgesi(SD siyah). Bu üç bölgenin hepsi alttan destekleyen aktin iskelete(gri bölge) bağlanırlar, aktin iskelet aracılığıyla diğer bölgelere de bağlanırlar. Ortada kontraktıl aygıt(CA).

Ayaksı uzantıların podokaliksin içeren apikal yüzeyleri, sialoproteinden zengin bir örtüyle (glikokaliks) kaplıdır. Negatif yüklü podokaliksin molekülleri, bitişik ayaksı uzantıları birbirinden iter ve Bowman aralığı içine plazma filtratının geçişi için slitin açık tutulmasını sağlar.³²

Podositlerin komşu ayaklı uzantıları, slit diafram adı verilen son derece özelleşmiş hücre-hücre kavşakları tarafından birbirine bağlanmıştır. Elektron mikroskopik düzeyde slit diafram, GBM'ın hemen altında, ayaklı uzantılar arasında, ince tek parçalı bir çizgi gibi görülebilir. Ayaklı uzantıların üç plazma membran bölgesi (bazal, apikal ve SD bölgeleri), aktinden kurulmuş iskelet aracılığıyla birbirine bağlanır (Şekil 2)²⁸. Ayaklı uzantılarda aktin, iskeletin bütünlüğü için gereklidir. Glomerüler filtrasyon bariyerinde podosit aktin ilişkili proteinlerde defekt, proteinüriyle sonuçlanır.^{33,34}

Major uzantılar ve hücre gövdesindeki hücre iskelet proteinlerin aksine, ayaklı uzantılar aktin, miyosin-II, alfa-aktinin, talin ve vinkülinden oluşmuş, temelde kontraktıl bir mikrofilaman yapıyla donatılmıştır.^{3,35}

Ayaklı uzantıların moleküler iskeleti aktin filamanlarından ve aktin ilişkili proteinlerden, miyosin, alfa aktinin ve sinaptopodin gibi proteinlerden meydana gelir. Bu proteinler, podositteki aktin iskeletin düzenlenmesi, onun dinamik şekilde korunması ve reorganizasyonun sağlanması için kritik öneme sahiptir.^{36,37}

Aktin bağlayan proteinler, alfa aktinin 4 ve sinaptopodinin, aktin demetleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir.^{38,39} Alfa aktinin-4, aktin filamanlarını çapraz bağlayan proteinlerden aktinin ailesinin bir üyesidir. Glomerülde, alfa aktinin-4 sadece podositlerde eksprese olur, ACTN4 gen kodlayan alfa aktinin-4 de mutasyonda ailesel FSGS'ye sebep olur, hastalığın başlangıcında farklı zamanlarda ayaklı uzantılarda silinme vardır.⁴⁰ Genleri tahrip edilmiş (knockout) veya alfa aktinin-4'ün aşırı eksprese olduğu farede ayaklı uzantılarda silinme ve proteinüriye yol açar.⁴¹

Podosit fonksiyonunun ana merkezini ayaklı uzantılar temsil eder, fonksiyonel üç membran bölgesinin tümü fiziksel ve fonksiyonel olarak ayaklı uzantıların aktin iskeletine bağlıdır, aktin yapımı podosit fonksiyonunda ve disfonksiyonunda ortak paydadır.^{36,42}

Slit Diafram

Komşu podosit ayakları uzantıları birbirine geçmiş tarak benzeri bir yapı gibidir, birbirinden 35-45 nm'lik filtrasyon poru denilen yarıklarla ayrılmıştır. Slit diafram denilen ince membranöz yapılar bu yarıkları köprüleştirir. 1974'de Rodewald ve Karnovsky elektron mikroskopik incelemelere dayanarak, slit diaframın hücre membranlarına paralel uzanan ince çubuk benzeri yapıların bir araya gelmesiyle oluşan fermuar benzeri bir yapıya sahip olduğunu rapor etmişlerdir.⁴³

Onların ortaya koyduğu modele göre SD, komşu ayakları uzantılarının hücre membranından, merkezde uzunlamasına yerleşen bir filamana kadar uzanan çapraz köprüleşmeler içerir. Daha sonra elektron tomografik çalışmalarla Wartiovaara ve Ofvastedt bu yapının sarmal şekilli bir ağ olduğunu belirlemişlerdir.⁴⁴ Slit diafram intraglomerüler basınç değişikliğinde podositlere elastikiyet sağlar, ayrıca podositleri apikal ve bazolateral bölümlere ayırarak fonksiyonel açıdan hücresel polarite kazandırır. Nefrinin 1998'de keşfedilmesi sonucunda slit diaframın fonksiyonu ve yapısının incelenmesi için yeni fırsatlar açılmıştır. Bu protein Fin tipi konjenital nefrotik sendromlu hastalarda pozisyonel gen mutasyonu sayesinde keşfedilmiştir. Fin tipi konjenital nefrotik sendrom, masif proteinüri ve SD'da (nefrin) yokluğuyla karakterize bir hastalıktır.⁴⁵

Slit diaframlar, "Erken S benzeri yapı dönemi"nde oluşan, epitel arasındaki apikal bağlantı kompleksinden köken alan yapılardır. Ayakları uzantılarının başlattığı kenetlenmeyi sıkı bağlantılar sabitleştirir.^{46,47,48} SD'lar "Kapiller halka evresi" süresince görülür ve yavaş yavaş sıkı bağlantıların yerini alır. Proteinüri ve ayakları uzantı kaybı veya silinmesiyle birlikte olan bir çok hastalıkta restorasyon vardır ve sıkı bağlantılar bitişik ayakları uzantılar arasında tekrar görünür.^{49,50} Yakın zamanlarda SD'da moleküler destek sağlayan yeni yapılar bulunmuştur. Nefrin, podosin ve NepH1 gibi diğer kavşaklarda bulunmayan bazı integral membran proteinleri, SD'da tanımlanmıştır. Bu özelleşmiş SD proteinlerine ek olarak, bir dizi protein, diğer konumlardaki bağlantılarla birlikte, SD'larda da yoğundur, P-kaderin, FAT, β -catenin, ve p120 catenini kapsayan bağlayıcı tip kavşaklar(adherens junction) proteinleri, ZO-1, CD2AP, MAGI-2 ve CASK gibi yapı proteinleri ve IQGAP ve α -actinin 4

içeren aktin bağlayan proteinler bunlardandır.^{51,52} SD'lar P-kaderin ve cateninleri içeren bağlayıcı tip kavşaklarla bazı morfolojik özellikleri paylaştığından, SD'ların modifiye olmuş bağlayıcı tip kavşakları temsil ettiği kabul edilir.⁵³ Ancak, sıklıkla sıkı bağlantı birimleriyle birlikte bulunan (ör. ZO-1^{54,55}, MAGI-2 ve CASK⁵⁶) bazı yapı proteinleri de SD'da mevcuttur ve nefrinle birlikte gösterilmiştir. Tipik sıkı bağlantılardan köken almalarına dayanılarak, onların nefrozda sıkı bağlantılarla yer değiştirdikleri düşünülmektedir.^{49,50}

SD'ların normalde sıkı bağlantılarla ilişkili membran proteinlerini de içerebileceği düşünülerek; morfolojik, biyokimyasal, ve bioinformatik teknikler kullanılarak sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonları incelenmiştir. SD'da bazı sıkı bağlantı proteinlerinin varlığı tesbit edilmiştir. Onların SD proteinleriyle etkileşimleri, hem normal, hem de puromisin aminonükleozid (PAN) ile deneysel nefrotik sendrom oluşturulmuş sıçanlarda gösterilmiştir.⁵⁷

Tablo 1: Bazı Slit Diafram Proteinleri

Nefrin

NEPH 1-2

Podosin

CD2AP

FAT 1

Adaptor Protein NCK

ACTN 4

Transient receptor potential cation channel 6 (TRPC6)

Tight junction proteinler (junctional adhesion molecule A, occludin, cingulin)

Slit Diafram ve Aktin

Podosit ayakları uzantıları, aktin demet ve liflerinden meydana gelen ve omurga görevi gören bir iskelete sahiptir. Aktin filamanları hem podositlere, hem de ayakları uzantılara şekil verir ve esneklik kazandırır. Aynı zamanda hareket etmesini de sağlar. Aktin filamanları bazal membrana ve slit diaframa çok sayıda adaptör protein sayesinde tutunur. Rho GDIa, podokaliksin, FAT1, Nck

½, sinaptopodin gibi proteinler, podositlerdeki aktin demetlerinin oluşturduğu iskeleti düzenleyen proteinlerdir ve glomerüler filtrasyon bariyeri için kritik öneme sahiptirler.⁵⁸ Aktinle slit diafram arasında proteinlerden oluşan bir bağlantı zinciri bulunur.

Podositlerde yer alan aktin demetlerinin oluşturduğu iskelet, hücrenin normal yapısının devamlılığı ve glomerülün seçici geçirgenliği için kritik öneme sahiptir. Bu yapılardaki mutasyonlar değişik klinik tablolara neden olabilirler.⁵⁹

Podositte aktin oluşumu nasıl düzenlenir?

Rho GTPazlar, bütün ökaryotik hücrelerde çok sayıda sinyal transdüksiyon yolağını kontrol eden moleküler anahtarlardır, asıl rollerinin aktin düzenlenmesi olduğu bilinmektedir. Podositlerin apikal yüzeyinden eksprese edilen major sialoglikoprotein olan podokaliksin, Rho A'yı sodyum-hidrojen değiştirici düzenleyici faktör (NHERF) ve ezrin üzerinden aktive ederek, aktin filamanların yeniden dağılımına yol açar. Podokaliksin eksprese etmeyen farelerde ayaksı uzantılar ve SD oluşmaz. Sinaptopodin pedisel düzleşmesinin tamirinde önemli rol oynar. Podositlerdeki Rho GTP'azların dengesi ayaksı uzantıların düzleşmesinde ve proteinüride kritik bir rol oynar.⁶⁰

Slit Diafram Proteinleri

Slit diaframla ilişkili proteinler nefrin, podosin, CD2AP, P-kaderin, NepH1 ve FAT1 gibi proteinlerdir (Tablo 1).⁶¹ Bu proteinler ayaksı uzantıların şeklinin korunmasında önemli olduğu gibi sinyal yollarında, endositozda, hücre farklanmasında, podosit canlılığında ve bazal membran için heparan sülfat üretiminde de rol oynamaktadırlar.

Nefrin

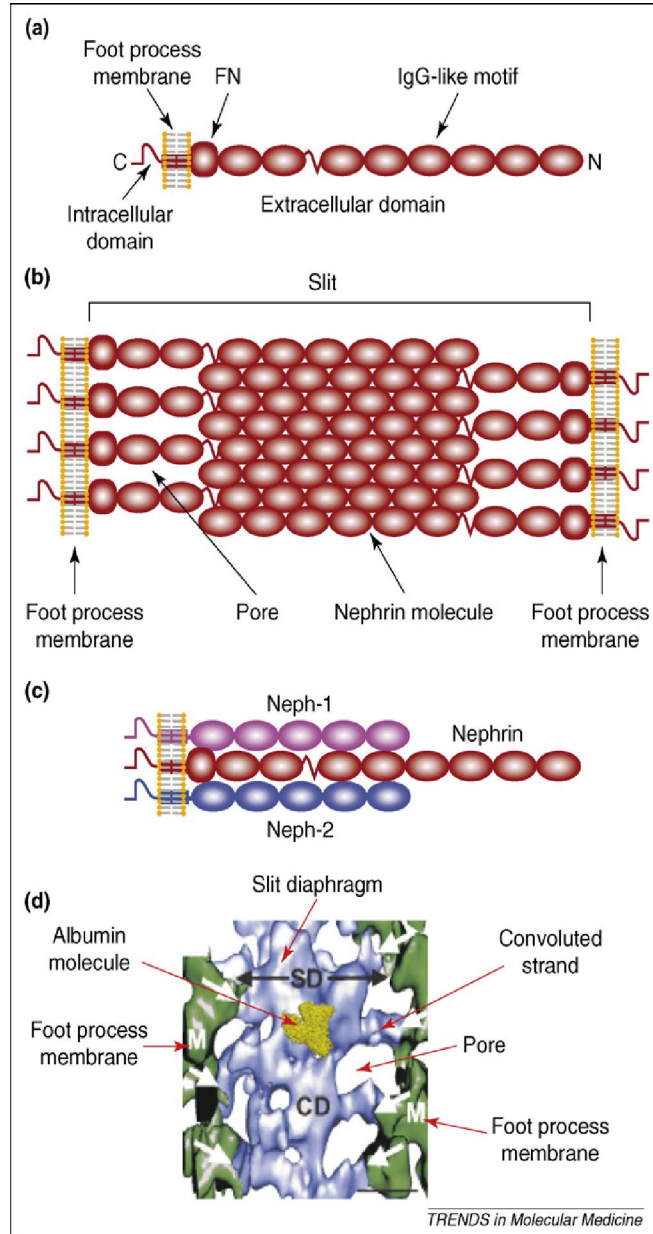
Nefrin immünglobulin ailesine ait bir proteindir ve slit diaframın önemli bir bileşenidir. Molekül ağırlığı 185-200 kDa kadardır.²² Bir adezyon molekülü olarak değerlendirilir. Slit diaframın filtrasyon bariyeri niteliğini fiziksel olarak

nefrin molekülleri sağlar. Slit diaframın yapısal açıdan anahtar bileşeni nefrindir. Nefrin transmembran yoldan uyarı gönderir, fosfatidilinositol-3 kinaz yoluyla protein kinaz B'yi aktive eder.⁶² İlk kez 2006 yılında Jones ve arkadaşları, nefrinin Nck adaptör proteinleri ile etkileşim gösterdiğini ve bu etkileşimin hücre iskeletini oluşturan aktin filamanlarının yeniden yapılanmasını sağladığını göstermişlerdir.⁶³

1998'de Tryggvason, nefrini kodlayan NPHS1 gen mutasyonunun, Fin tipi konjenital nefrotik sendroma sebep olduğunu göstermiştir.⁶⁴ Nefrin 8 distal IgG benzeri motifli kısa bir hücre içi parçası olan, ve bir proksimal fibronektin tip III benzeri motifli bir hücre dışı parçası olan bir transmembran proteindir (Şekil 3). Nefrinin hücre dışı parçasının boyu yaklaşık 35 nm dir. Nefrin moleküllerinin SD'da por yapısı oluşmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.^{65,66}

Yüksek çözünürlüklü elektron tomografi metoduyla slit diaframın çaprazlaşmış kıvrılan iplikli yapılardan oluştuğu, albumin büyüklüğünde veya daha küçük boyutta porların bu bölgede lokalize olduğu gösterilmiştir (Şekil 3).^{22,67} İmmun elektron mikroskopi ve elektron tomografi yöntemlerinin kombinasyonu, nefrinin distal IgG1 ve IgG2 motiflerinin slitin orta kısmında lokalize olduğu gösterilmiştir.⁶⁷

Nefrinin hücre dışı bölümleri hücre yüzeyindeki proteinlerle ilişkili görünmektedir.⁶⁸ Komşu ayaklı uzantıların nefrin molekülleri, slit ortasında birbirleriyle etkileşir. Nefrin gen mutasyonları, aktinin oluşturduğu hücre iskeletinde parçalanmalara ve glomerüler hastalıklara neden olur. Nefrin gen ekspresyonunun düşük yoğunlukta olması, mutasyon olmasa da podosit hasarı ile sonuçlanabilir, klinik olarak minimal değişiklik hastalığı tablosu ortaya çıkabilir.⁶⁹



Şekil 3: ²² a) Nefrin molekülü bir hücre içi C-terminal bölge içerir, bir transmembran bölge ve sekiz IgG benzeri motifli ve bir fibronektin tip III benzeri(FN) motifli hücre dışı bölge içerir.b) Podosit hücrelerinden ayrılan komşu ayaklı uzantıların nefrin moleküllerinin homofilik etkileşimler sayesinde slitin merkezinde etkileştikleri düşünülmektedir, böylece merkezi dansitenin her iki yüzü üzerine porlarla fermuar benzeri bir yapı oluşur.c) Nefrin moleküllerinin ayrıca kısa Neph molekülleriyle hücre yüzeyinde etkileştiği düşünülmektedir. d) SD'nin elektron tomografik analizi, aslında bir por membran olduğunu doğrulamıştır. İpliksi(filamentöz) yapılar muhtemelen nefrinin hücre dışı bölümünün proksimal kısmını temsil eder. Por yapıları ve porların albumin molekülü kadar veya daha küçük olduğu gösterilmiştir.

SD'nin sitoplazmik eklenme yerinde, ZO-1,^{70,71} podosin,^{72,73} CD2AP,^{74,75} ve densin proteinleri⁷⁶ mevcuttur. Bu proteinlerin birbirleriyle etkileşime girdiği biyokimyasal metodlarla kanıtlanmıştır.⁷⁷ Bazı podosit proteinlerinin keşfi ve onların nefrin,^{78,79} CD2AP,⁸⁰ alfa-aktinin 4,⁴⁰ podosin,⁸¹ TRPC6,^{82,83} ve Neph 1,⁸⁴ içeren mutasyonlarının incelenmesi, proteinürinin patogenezi ışık tutmuştur ve glomerüler filtrasyon bariyerinin fonksiyonunun sürdürülmesinde SD ve podositlerin kritik rolü vurgulanmıştır.

Podosin

Podosin, stomatin protein ailenin bir üyesidir, yalnızca podositlerde SD'da eksprese olur. Molekül ağırlığı 42 kDa kadardır.²² Glomerüler slit diaframın temel bileşenlerinden biridir. Slit diaframın diğer proteinleri ile birlikte podosit ayaksı uzantılarının iskeletini oluşturur. Podosini kodlayan gen (NPHS2) kromozom 1q25-31'de lokalizedir.⁷⁷ İlk kez 1995 yılında Fuchshuber ve arkadaşları 1. kromozom üzerinde steroide dirençli nefrotik sendrom için bir loküs tesbit etmişlerdir, daha sonra aynı araştırmacılar bunun NPHS2 geni olduğunu ve podosin diye isimlendirilen bir transmembran proteini kodladığını ortaya koymuşlardır.⁸⁵ NPHS2 (podosin) geninde mutasyon konjenital nefrotik sendrom Tip II olarak bilinir.

Podosinin NPHS2 geni tarafından kodlandığının ortaya çıkmasından sonra çeşitli hastalıklardaki rolü daha çok tartışılmaya başlanmıştır.^{86,87} Podosin membrana bağlı bir hücre içi proteindir ve slit diafram kompleksinin organizasyonu ile ilişkilidir. Slit diaframın başlangıç noktasında podosit ayaksı uzantılarının membranında lokalizedir, nefrinin sitoplazmik kısmı ve CD2AP'ye kendi C-terminusu aracılığıyla bağlanır, filtrasyon bariyeri fonksiyonunu ve devamlılığını sağlar.⁸⁸ Bu kompleksin sabitleştirilmesinde, nefrinin hücre iskeletine bağlanmasında ve endoplazmik retikulumdan hücre membranına taşınmasında görev alır.⁸⁹ Podosin lipid raflarda kümelenir. Lipid raft içinde oligomer ve dimerler oluşturarak sinyal fonksiyonunda da görev alır.⁹⁰ Podosin-TRPC6 kompleksinin SD'da bir mekanosensör gibi fonksiyon yaptığı düşünülmektedir.⁹¹ Podosin genleri tahrip edilmiş farede proteinüri ve şiddetli mezangiyal skleroz gelişmiş ve doğumdan sonra birkaç günde ölmüştür.⁹²

Podosin genleri tahrip edilmiş farede SD'da nefrinin bulunmadığı gösterilmiştir.⁹² Podosin mutasyonu otozomal resesif olmasına rağmen, erken başlangıçlı çocukluk çağı FSGS görülmüştür.⁹³ Podosindeki genetik mutasyonların steroide dirençli nefrotik sendroma yol açtığı bilinmektedir.

CD2 İlişkili Protein (CD2AP)

İlk olarak T lenfositlerde CD2 reseptörleriyle etkileşime giren bir adaptör protein olarak tanımlanan CD2AP, aynı zamanda SD'ın hücre içi tutunma bölgesinde lokalize olmuştur. CD2AP, 80-kDa bir proteindir, antijen sunan hücreler ve T hücreleri arasında bağlantının stabilizasyonu için kritik öneme sahiptir.⁹⁴ CD2AP nefrinle podosin aracılığıyla etkileşime girer. Direk olarak aktin liflerine bağlanma kapasitesiyle aktin dinamiklerinde ve SD'ın devamlılığında önemli rol oynar. Ayrıca CD2AP reseptör aracılı endositozda da görev alır.⁹⁵ CD2AP nefrine ve podosine bağlıdır, aktin iskeletinde sinyal uyumunu sağlamaya ilgilidir. CD2AP olmayan hayvanlarda glomerüler hasarın yanı sıra podositlerin plazma proteinlerini endositozla almasında da problem görülür.⁹⁵ CD2AP genleri tahrip edilmiş farede konjenital nefrotik sendrom oluşurken hayvanın böbrek yetmezliğinden 6-7 haftada öldüğü görülmüştür.⁹⁴ Ek olarak, CD2AP ve sinaptopodin için heterozigot bileşim, FSGS benzeri glomerüler hasarlı farede proteinüriyle sonuçlanmıştır.⁹⁶ CD2AP mutasyonları FSGS'li hastalarda bulunmuştur.⁹⁷ Yakın zamandaki bir çalışmada CD2AP'nin sitozolik katepsin L'nin ekspresyonunu düzenlediği ortaya çıkarılmıştır.⁹⁸

P-Kaderin

P-Kaderin, glomerül gelişiminin erken evrelerinde eksprese olur.⁹⁹ Glomerülün "S benzeri evre"sinin geç döneminde ise ZO-1 ve nefrinle birlikte eksprese olur, erişkinlerde SD'da bulunur.¹⁰⁰ Spesifik antikorlarla P-kaderinin blokajı sıçanlarda proteinüriye yol açar.¹⁰¹

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), büyüme faktörleri ailesinin bir üyesidir ve VEGF reseptörleri (VEGFR) yoluyla etkili olurlar. VEGF podosit kaynaklıdır, glomerüler endotel hücrelerin ve fenestraların gelişiminde ve fonksiyonlarının sürdürülmesinde çok önemli rolleri vardır.¹⁰² Ayrıca, VEGF endotel bütünlüğü ve mezangiyal hücreler için de gereklidir. VEGF eksikliğinde endotel hücre hasarı, nefrin ekspresyonunda azalma, ve proteinüri görülür.

VEGF üretimi podositlerde yaygındır ancak üretimin nasıl düzenlendiği çok açık değildir. Glomerüler bazal membran matriksi ile podosit etkileşiminin bu ekspresyonu düzenlediği ileri sürülmüştür.¹⁰³

Komşu Hücreler ve Podositler Arasında Haberleşmenin Önemi

Tüm glomerül fizyolojisine podositin katkısını değerlendirmek için podositin komşu hücrelerle ilişkileri tanımlanmalıdır.¹⁰⁴ Podosit spesifik genleri tahrip edilmiş farede, endotel hücreleri üzerinde etkili VEGF'in üretimiyle sağlıklı fenestralı endotelin sürdürülmesinde podositlerin rolü saptanmıştır.¹⁰⁵ Özellikle glomerüler hasarı değerlendirirken, podositler ve mezangiyal hücreler arasındaki ilişki de önemlidir. Podositlerden ve mezangiyal hücrelerden üretilen kemokinler GBM'a yapışmada ve onların lokal göçünde etkilidir. Bu kemokinler aynı hücreler üzerinde onların reseptörleriyle etkileşirler.^{106,107}

Podosit-GBM Arayüzü

Podosit ayaklı uzantıları, iki farklı hücre matriks adezyon kompleksi üyesi, integrinler ve distroglukanlar tarafından GBM'na bağlanır. İntegrinler heterodimerik transmembran reseptörleridir, GBM'da onların ligandlarına bağlanırlar. Böylece matriks altına hücre sabitlenir. Podosit taban plağında major integrin $\alpha3\beta1$ 'dir. Onun podosit morfolojisi ve fonksiyonu için fizyolojik uygunluğu ilk kez anti $\beta1$ integrin antikor enjeksiyonundan sonra kemiricilerde proteinüri, GBM'dan podosit ayrılması ve ayaklı uzantıların silinmesinde gösterilmiştir.¹⁰⁸ İntegrinler paxillin, talin, vinkulin, α -aktinin ve filamini içeren aktin ilişkili proteinler ve integrin takımı sayesinde hücre içi aktin iskelete GBM'ı

bağlarlar. İntegrinler aktin filamanları için sadece bir fiziksel tutunma yeri değildir, ayrıca aktin dinamiklerini de düzenlerler, fokal adezyon kinaz sayesinde hücre dışından gelen uyarıya cevap verilmesinde etkilidirler. İntegrin bağlı kinaz (ILK) hücre şekli, motilitesi ve aktin polimerizasyonunun ayarlanmasında etkilidir. İntegrinler hücresele olaylara cevap olarak, onların adeziv karakterlerini de değiştirebilirler.¹⁰⁹

GBM, integrinlere ek olarak, α ve β distroglikan ve utrophin sayesinde podosit aktin iskeletiyle bağlantılıdır.¹¹⁰ Bu adezyon molekülleri, filtrasyon bariyerinin fonksiyonu ve ayaklı uzantıların yapısının korunmasında çok önemlidir. Bunlarda görülebilecek herhangi bir defekt podosit hasarı ve proteinüriye yol açar.¹¹⁰

Glomerüler Filtrasyon Bariyerinde Sıvı Akışının Düzenlenmesi

Slit diafram komşu ayaklı uzantılara bağlanır, idrar içine büyük moleküllerin kaçmasını engellemek için esansiyeldir. Ancak, bu fiziksel bariyerde büyük moleküllerin "tıkanıklığından" nasıl kaçabildiği bilinmemektedir. 2007 yılında transmisyon elektron mikroskop incelemeleriyle, podosit ve GBM arasında yer yer "subpodositik aralık" adı verilen bir boşluk saptanmıştır.¹¹¹ Subpodositik aralık podosit hücre gövdesi ve onun major uzantılarına bağlanan, tüm GBM'ın %60'nı örten kısıtlı bir alandan meydana gelir.¹¹¹ Salmon ve arkadaşları perfüzyon yapılan glomerülde in vivo multiphoton görüntüleme tekniği kullanarak, subpodositik aralıktaki proteinlerin yıkanarak tıkanıklığın giderildiğini göstermişlerdir. Bunun da GBM boyunca podositin sürekli hareketiyle ters filtrasyon oluşturularak yapıldığını öne sürmüşlerdir.¹¹² Endositoz da podosit filtresinin tıkanmasını önleyen başka bir mekanizmadır.¹¹³ Yakın zaman önce, albumin endositozu kültür şartlarında fare ve insan podosit hücrelerinde tanımlanmıştır.¹¹⁴

Proteinüri

İdrarla günlük protein atılımı fizyolojik koşullarda 150 mg'ın altındadır ve idrar volümüne bağlı olarak 2-10 mg/dl arasında değişir. Tekrarlanan

ölçümlerde 150 mg/gün üzerinde protein atılımının saptanması proteinüri olarak adlandırılır. İdrarla 24 saatte 3.5 gr ve üzeri protein atılımı veya kan proteinlerini düşüren herhangi bir proteinüri nefrotik sendrom olarak tanımlanır.¹¹⁵

İdrarla atılan protein miktarının ölçülmesi ve içeriğinin belirlenmesi altta yatan ciddi bir böbrek hastalığının ilk bulgusu olabilir. Proteinürinin takibi tedaviye alınan cevabın değerlendirilmesinde de yardımcı olur.¹¹⁵

Plazma proteinlerinin 1/3'ü albumin, diğerleri ise α , β , γ globulinlerdir. Molekül ağırlığı 40 kDa'dan küçük olan plazma proteinleri glomerüler bazal membrandan direkt geçerek proksimal tübül hücreleri tarafından geri emilir.¹¹⁵ Molekül ağırlığı 69 kDa olan albumin çok düşük miktarlarda filtre edilir. Proteinüri; glomerüler filtrasyon bozukluğu, tübüler sıvıda protein artışı ve tübüler emilimde değişiklik sonucu meydana gelir. Glomerüler hastalıklar genellikle nefrotik sendrom ile ortaya çıkmakta ve glomerüler hastalığın mekanizması önem kazanmaktadır.¹¹⁶ Önceden, glomerüler bazal membran yapısındaki değişiklikler ve ayaksı uzantıların bazal membrandan ayrışması, proteinürinin temel nedeni olarak kabul görmekteydi. Günümüzde bazal membranı oluşturan moleküllerdeki değişiklikler ve elektriksel yük değişikliğine neden olan antikorlar da proteinüriye neden olarak gösterilmektedir. Ancak tüm bunların proteinüriye sekonder gelişmiş olabileceği fikri de mevcuttur.¹¹⁷ Elektron mikroskopik incelemelerde izlenen ayaksı uzantılarda silinme, epitel hasarına sekonder olarak ayaksı uzantıların hücre gövdesine doğru retraksiyonu ile oluşmaktadır. Epitelde incelleme ve erozyon sonucunda üriner boşluk ile direk temasa geçen bazal membrandan protein kaybı kaçınılmazdır.¹¹⁷

1998 yılında Fin tipi konjenital nefrotik sendroma ilişkin nefrin kodlayan NPHS1 geninin bulunmasıyla proteinüri patogeneziyle ilgili önemli adımlar atılmıştır.¹¹⁸ Hayvan modellerinde nefrin eksikliğinin masif proteinüriye yol açtığı gösterilmiştir.¹¹⁹ Podosit zedelenmesi membranöz glomerülo nefrit, minimal değişiklik hastalığı, fokal segmental glomerüloskleroz, diyabet gibi bir çok hastalıkta görülmektedir. Erken dönemde hastalığa bağlı olmaksızın morfoloji değişmezken, slit diaframda moleküler yapıda değişiklikler olmaktadır. Glomerüler patolojilerde elektron mikroskopik incelemede; hücre gövdesinde zayıflama, podosit hipertrofisi, psödokist oluşumu, lizozomal elamanların

sitoplazmada birikmesi, ayaklı uzantılarda inceltme ve düzleşme, epitel vakuolizasyonu, sıkı bağlantı formasyonu, filtrasyon yarıklarında azalma ve epitelde yer yer bazal membrandan ayrılmalar gibi değişiklikler görülebilir.⁶⁰ Ayaklı uzantılarda silinme ile proteinüri arasında bir ilişki olduğu düşünülmesine rağmen bunun mekanizmaları halen araştırılmaktadır.⁶⁰

Silinme ve Proteinüri Patogenezi

Podositlerin moleküler patolojisine dayanarak ayaklı uzantılarda silinme ve proteinürinin dört major nedeni tanımlanmıştır.^{120,121}

1) Ayaklı uzantıların iskelet yapısında bozulma aktin ve birlikte çalışan proteinlerde reorganizasyona yol açar:

Ayaklı uzantıların hücre iskeletinde bulunan önemli moleküller aktin, α -aktinin ve sinaptopodindir. Aktin, filtrasyon yarıklarının devamlılığında belirleyicidir. α aktinin-4 aktine bağlanır. α aktinin bazal membrandaki integrinler ve slit diaframdaki beta-katenin molekülleriyle bağlantılı olduğundan, ayaklı uzantıların değişik kısımları arasında bağlantıyı sağlar. Bu sebeple podosit hasarının sebebi veya bölgesi ne olursa olsun ayaklı uzantıların silinmesinde aktin iskelet ortak yolu oluşturur.^{110,122} Ayaklı uzantılardaki üç fonksiyonel bölgeden (apikal, bazal ve SD bölgeler) birinin aktin iskeletinde oluşan değişiklik, koordine stres liflerinin, dens bir ağa dönüşmesine neden olur. Bu da ayaklı uzantıların düzleşmesine yol açar. Aktin mikrofilamanları artarak, bazal hücre zarına yapışan geniş bir kuşak oluşturur. Bu geniş kuşak içinde aktin bazlı mikrofilamanlar her yöne doğru seyrederek. Bu durum elektron mikroskop ile gösterilmiştir. Shirato ve arkadaşları, α aktinin ve sinaptopodinin her ikisinin de podositte pedisel silinmesiyle aktin demetleri kuşağı üzerinde dağıldığını göstermişlerdir.¹²³

Fizyolojik ve patolojik durumlarda podositlerdeki aktin demetlerinin oluşumunu düzenleyen moleküler mekanizmalar çok iyi bilinmemektedir.⁶⁰ Yapılan çalışmalara göre SD'dan gelen sinyaller aktin reorganizasyonuna ve bunun sonucunda ayaklı uzantıların düzleşmesine neden olur. Ayaklı uzantılar son derece dinamiktir, dakikalar içinde reorganize olabilirler.⁹⁵

Pedisel düzleşmesi geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilir. Preeklampsi ve hayvan modelleri dışında hemen hemen tüm proteinürilerde pedisel düzleşmesi görülür.⁶⁰

2) SD kompleksi ve lipid raftlarının bölgesel ve oransal organizasyonunda bozulma:

Nefrinin podosit ayaksı uzantılarının silinmesindeki rolü, antinefrin enjeksiyonu yapılarak oluşturulan hayvan modellerinde veya NPHS1 gen inaktivasyonu sonucunda proteinüri ve epitel silinmesinin gözlenmesiyle ortaya konulmuştur.¹²⁴ Nefrin oligomerleri plazma membranındaki sinyal mikrodomanleri olan lipid tabakası ile ilişkilidir. İn vivo olarak podosit spesifik gangliozit enjeksiyonunda nefrin apikal kutba yer değiştirir ve tirozin fosforilasyonu gerçekleşir.¹²⁴ Nefrin molekülündeki tirozin rezidülerinin fosforilasyonu SD kaybına neden olan sinyalleri başlatmaktadır.

3) Podositlerin negatif yüklü apikal membran bölgesinin düzenlenmesi:

Apikal yüzdeki negatif yükün devamlılığını sağlayan en önemli molekül podokaliksindir.¹²⁵ Podokaliksin podositler ve endotel hücreleri tarafından glomerülogenez sırasında sentezlenir. Podositlerin hücre yapısının oluşumunda podokaliksinin çok önemli rolü vardır. Negatif yüklü podokaliksin molekülleri bitişik ayaksı uzantıları birbirinden iter ve Bowman aralığı içine plazma filtratının geçişi için slitin açık tutulmasını sağlar. Podokaliksin paryetal hücrelerin podositlere yapışmasını da önler.¹²⁵

Podokaliksin eksikliği immatür, yassı podositlerle sonuçlanmaktadır. Apikal membranda yer alan bir protein olan GLEPP-1, glomerüler basınç/filtrasyon oranını düzenler. Minimal değişiklik hastalığında bu moleküllerin ekspresyonunun korunduğu, ancak çökme (kollapsing) glomerülopatisi ve FSGS'de podokaliksin ve GLEPP-1 ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır.¹²⁵

4) Podosit- GBM etkileşiminde bozukluk oluşması:

Hem integrinler hem de distroglikanlar, podosit hücre iskeletine adaptör moleküller aracılığıyla bağlıdırlar. $\alpha\beta 1$ integrin glomerüler bazal membranda

fibronektin, tip 4 kollajen ve laminine bağlanarak yapışma odakları oluşturur. Bu bağlantı hücre içi aktin iskeleti organize ederek podositlerin şeklinin korunmasına yardım eder. Bu nedenle ekstrasellüler matrikste oluşan veya buraya ulaşan her çeşit mekanik stres podosit hücre iskeletine de ulaşır.⁹⁵ İntegrinlerin bağlantı bölgelerinin antikorlarla blokajı epitelin bazal membrandan ayrılmasına neden olur.¹²⁶ Bazal membrandaki matriks proteini ile podositteki aktin arasında bağlantıyı distroglikanlar sağlamaktadır.²⁸ Minimal değişiklik hastalığında proteinüri geliştikçe distroglikan ekspresyonu azalmaktadır, distroglikan ekspresyonu ile hastalığın aktivitesi negatif korelasyon göstermektedir.¹²⁶ Ayaksı uzantılar normale döndükçe distroglikan ekspresyonu da normalleşmektedir. GBM'dan epitel hücrelerinin ayrılmasıyla oluşan erozyone (soyulmuş) alanlar paryetal hücrelerle temas ederek yapışıklığa ve sürecin sonunda da skar oluşumuna neden olur.¹²⁶

İnce Yapı(ultrastruktürel) Değişikliği-Proteinüri İlişkisi

Proteinüri ve ince yapı değişiklikleri arasındaki ilişkiyi tanımlayabilmek için iki hipotez öne sürülmüştür.

Birinci hipoteze göre, GBM' dan epitel hücrelerinin ayrılmasıyla epitel örtüsünde "fokal açıklıklar" oluşur ve proteinüri meydana gelir. Bu alanlarda artan sıvı GBM filtresinden karşı tarafa üriner boşluğa plazma proteinlerinin sürüklenmesine sebep olur.¹²⁷

GBM'den podositlerin ayrılmasında ve böylece fokal açıklıkların oluşmasında rol oynayabilecek iki olası mekanizma öne sürülmüştür:

- **Epitel**
hücreleri ve GBM normalde birbirine sıkıca bağlıdır, podosit hücre membranının GBM bağlantılarının hasar görmesi GBM'den ayrılmaya neden olur.
- **Ayaksı**
uzantılarda retraksiyon, bitişik podositlerin ayrılmasına yol açar, ayaksı uzantıların ayrılmasıyla podosit bağlantılarında büyük defektler görülebilir.¹²⁷

Hayvan modellerinde, proteinürinin başlangıcı GBM'da erozyone bölgelerin gelişimiyle çakışır ve bu gibi alanlar insan nefrotik böbrekleri üzerinde yapılan çalışmalarda tanımlanmıştır.¹²⁸

Proteinüri ile ilgili ikinci hipotez ise; nefrozda epitel hücreleri boyunca endositozla büyük miktarda proteinin, sitoplazmik veziküller ve vakuoller yoluyla idrar boşluğu içerisine geçtiğidir. Bu durum elektron mikroskopik çalışmalar tarafından desteklenmiştir. Sıçanlarda akut aminonükleozid nefrozunda ve insan proteinürik böbreklerinde epitel hücrelerinde lizozomlar, fagozomlar ve pinositotik vezikül miktarlarının artmasıyla ortaya konulmuştur.¹²⁹ Pinositotik invaginasyonlar da aminonükleozid nefrozlu sıçanlarda bir çok kez tanımlanmıştır.^{129,130} Vakuollerin hücrede bir yüzü idrar boşluğuyla, diğer yüzü GBM'ın üzerinde hücre dışı boşlukla olacak şekilde iletişim kurduğu düşünülmüştür. Nefrozda ayaksı uzantıların düzleşmesi pinositoz ile proteinlerin transportu ve alımını hızlandırabilir.¹³¹ Kim ve arkadaşları farede podosit endositozu defektinde (CD2AP defekti) glomerüler hasarda hassasiyet artışını, podositte protein atılımının glomerüler hastalıklarda önemli modulatör olabileceğini ileri sürmüşlerdir.¹³²

Günümüzde her iki hipotezi de destekleyen araştırmalar olmasına rağmen, kesin mekanizma halen tam olarak anlaşılamamıştır.

Geleneksel olarak, podositteki değişikliğin GBM'da kaçağın artmasıyla ilişkili olduğuna inanılmaktadır.¹³³ Geçen birkaç yıl boyunca, genetik hastalıklar üzerine çalışmalar podosit slit diaframının protein geçişini engellemede GBM'dan çok daha önemli olduğunu göstermiştir.

Aktin Dinamikleri ve Tamir Süreci

Farklı fare modellerinden elde edilen verilere göre aktin dinamikleri sadece ayaksı uzantıların ve aralarındaki bağlantıların gelişiminde değil, hasar ve tamir sırasında da rol oynar. Podositler motil hücrelerdir. Podosit hasarı ve onarımı süreci, dinamik aktin polimerizasyonu ve yapım-yıkım döngüsünü içerir. Başlangıçta ayaksı uzantıların düzleşmesinin pasif bir süreç olduğu düşünülmekteyken, günümüzde özel bir sinyal molekülünün aracılık ettiği çok aktif bir aktin reorganizasyonu olduğu bilinmektedir.¹³⁴

Podositler pek çok hastalıkta hasar görebilir. Aktindeki değişiklikler, filtrasyon yarıklarının (porlarının) düzleşmesine ve SD'ların apikal tarafa doğru yer değiştirmesine neden olmaktadır.⁹⁵

Sıçanlarda, ayaksız uzantıların silinmesi, böbrek içine protamin sülfat enjeksiyonundan sonra dakikalar içinde başlar ve normal podosit morfolojisi heparan sülfat perfüzyonu eklendikten sonra dakikalar içinde restore olabilir.¹³⁵

Masugi nefriti oluşturulan sıçanlarda¹³⁶; ayaksız uzantıların düzleşmesinin bir gün içinde meydana geldiği, bu alanlarda belirgin hücre iskeletinin görülmeye başlamasının üç günü bulduğu görülmüştür. Dens mikrofilamanların her yöne seyrettiği, ara ara bir araya gelerek dens cisimler oluşturduğu görülmüştür.

Proteinürik böbreklerde slit porların sayısında azalma olabilir, slit porlar daralma ve kapanma gibi değişiklikler de gösterebilir. Bu durum ultrafiltrasyonu kısıtlar. Bu durum daha önce aminonükleozid nefrozlu sıçanlarda¹³⁷ ve nefrotik insan böbreklerinde tanımlanmıştır.¹²⁹

Glomerüloskleroz Mekanizmaları

Podositte salgılanan bazı maddelerin parakrin etkisi nedeniyle hasar ve glomerüloskleroz oluşabilir.¹³⁸ Podosit hasarının başlangıcından skleroza gidiş, başlangıçtaki podosit hasarının derecesine bağlıdır ve çok hızlı seyredebilir.¹³⁸ Reinke ve Kriz, glomerüler hasarın tipi ne olursa olsun, podosit sayısında azalmanın glomerüloskleroz gelişimine katkı sağladığını öne sürmüşlerdir. Hasarlanan glomerüler hücre tipinden bağımsız olarak, ilerleyici glomerüler skarlaşmada ortak yol, intraglomerüler basınç artışıdır. Glomerüler kapiller içindeki hidrostatik basınç bazal membranı Bowman kapsülüne doğru iter ve yapışıklık oluşumuna yol açar. Kapiller halkada hyalinozis ve ilerleyici skarlaşma başlar.¹²⁴ Bu basınç glomerüler hücrelerde mekanik stres oluşturur. Mezangiyal hücrelerde mekanik stres proliferasyona yol açarken, podositlerde apoptozis ile sonuçlanır. Podositlerdeki mekanik stres siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinde artışa neden olurken, proliferasyon bu mekanizma ile engellenmektedir.¹²⁴

Tablo-2: Primer glomerülonefrit tipleri.¹³⁹

Minimal Değişiklik Hastalığı (MDH)
Membranoproliferatif Glomerülonefrit (MPGN) <ul style="list-style-type: none">• Tip-1 MPGN• Tip-2 MPGN (Dens depozit hastalığı)• Tip-3 MPGN (Mikst tip)
Fokal Segmenter Glomerüloskleroz (FSGS)
Membranöz Glomerülonefrit (MN)
IgA Nefropatisi (Berger Hastalığı)

Podositopatilerin Sınıflandırılması

İnsanlarda proteinüri ile seyreden glomerüler hastalıkların çoğunda ve deneysel olarak hayvanlarda oluşturulan bazı glomerüler hastalıklarda podosit hasarı görülmektedir. Proteinürik hastalıklar çok farklı sebeplerden kaynaklanabilir, hastalıkların süreci, klinik bulguları ve prognozu da değişiklik gösterebilir. Benzer klinik görünümde olmalarına rağmen spesifik laboratuvar bulguları ve histolojik özelliklerinin bulunmaması tanı ve tedavi güçlüğüne sebep olmaktadır.

Podositopatilerden oldukça sık görülen ve ayırıcı tanısı da zor olanlardan ikisi minimal değişiklik hastalığı ve FSGS'dir. Membranöz nefropati ve membranoproliferatif glomerülonefrit de sık görülmektedir (Tablo 2)¹³⁹.

Minimal Değişiklik Hastalığı (MDH)

MDH çocukluk çağında sık görülür, özellikle erkek çocuklarda daha sıktır. Erişkinlerde de sık rastlanmaktadır. MDH'da görülen proteinüri selektif proteinürüdür ve idrar yüksek oranda albumin içerir.¹⁴⁰ Işık mikroskopik incelemede patoloji görülmeyen, selektif proteinürisi olan ve elektron mikroskopik incelemede ayaksız uzantılarda silinme görülen klinik olgular MDH formudur.¹⁴⁰

Elektron mikroskopik bulgular:

Genellikle elektron mikroskop ile ayaksız uzantılarda silinme görülür. Ayaksız uzantıların normal haline dönmesiyle MDH'da remisyon görülür. Elektron mikroskop ile görülebilen değişiklikler; slit porların yapısında bozulma (daralma,

kapanma, genişleme), slit diaframda apikale yer değiştirme, podositlerde vakuolizasyon, bazal membrandan fokal ayrışmalardır. GBM genellikle normal yapıda ve kalınlıktadır.¹²⁷

İmmunohistokimyasal bulgular; immunohistokimyasal çalışmalarda genellikle nefrin ekspresyonunun kontrol grubuna oranla azaldığı saptanmıştır.¹⁴¹

Patogenez; kesin olarak ortaya konamamıştır. Dolaşımda bulunan ve podositler için toksik olan bazı faktörlerin etkili olabileceği düşünülmektedir. Anormal immun yanıt permeabilite artışına neden olabilir. MDH'da glomerüler elektriksel yük kaybı da önemlidir. MDH'lı hastaların T lenfositlerinde vasküler permeabilite faktörü belirlenmiştir. Plazma ve idrarda eriyebilir immün yanıt baskılayıcı (soluble immun response supressor-SIRS) ve hemopeksin gibi katyonik maddeler izole edilmiştir. Bunlar GBM'da yük değişikliğine neden olmaktadır.¹⁴²

Prognoz; çocuklarda steroid tedavisiyle sekiz haftada %90-95 oranında remisyon izlenir. Erişkinde sekiz haftalık ek tedavi sonrası remisyon oranları %80'lerdedir.¹⁴³

İnsanlarda steroide duyarlı minimal değişiklik hastalığı proteinüriyle ilişkilidir ve ayaksı uzantıların silinmesi glukokortikoid tedavisinin başlamasından sonra günler içinde tamamen restore olabilir.⁶⁰

Membranoproliferatif (Mezangiokapiller) Glomerülonefrit (MPGN)

Çocuklarda ve erişkinlerdeki nefrotik sendromun % 10-15'inden sorumludur. Hastalığın ismi ışık mikroskopide görülen diffüz mezangiyal hipersellülerite ile bazal membran kalınlaşmasından türetilmiştir.

Nedenleri:

1. İdiyopatik:
 - Tip I (Subendotelyal birikintiler)
 - Tip II (Dense depozit hastalığı)
 - Tip III (Tip I+Subepitelyal birikim)
2. Sekonder : Enfeksiyonlar, malignite vb.

Patoloji

Tip I: Işık mikroskopide diffüz global kapiller duvar kalınlaşması ve endokapiller proliferasyon en yaygın histolojik belirtidir. Mezangiyal ve endotel hücreler arasında bazal membran benzeri yeni bir madde birikimi ve mezangiyal hücrelerin GBM'a uzanması nedeniyle glomerüler kapiller duvarda çift kontur görünümü (duplikasyon görüntüsü) mevcuttur.

İmmunfloresan mikroskopik incelemede; mezangiyal ve subendotelyal IgA, IgG, IgM, C3, C4 ve Clq depolanması görülür.

Elektron mikroskopik incelemede; mezangiyum ve subendotelyal bölgede immün kompleks birikimleri görülür.

Tip II: Tip-II MPGN “dens depozit hastalığı” olarak da bilinir ve transplantasyon sonrası en sık nükseden glomerülonefrit tipidir.

İmmunfloresan mikroskopik incelemede; Ig birikimi yoktur, ancak kompleman birikimi hakimdir. Ayrıca, birikim glomerül bazal membranda, Bowman kapsülünde ve tübülüslerde karakterizedir.

Tip III: Tip I + Subepitelyal birikimler (membranöz glomerülonefrite benzer).

Genellikle genç yaşlarda görülür. (Tip I-25 yaş, Tip II 15 yaş). Olguların çoğu nefrotik sendrom tablosundadır ve hematüri, hipertansiyon, böbrek fonksiyon bozukluğu gibi bulgular sık görülür. Laboratuarda; hematüri, proteinüri görülür, serum kompleman 3 ve 4 genellikle düşüktür.

Olguların 1/3'ü spontan remisyon, 1/3'ü kısmi remisyon gösterir, 1/3'ü progressif seyreder.

Fokal Segmental Glomerüloskleroz(FSGS)

Kötü gidişli ve tedaviye dirençli bir glomerülopatidir. Seksenli yıllarda erişkinlerde en sık nefrotik sendrom sebebi membranöz nefropati iken son yıllarda FSGS insidansı artış göstermiştir.¹⁴⁴ Bazı kaynaklarda çocuklarda %20, erişkinde %40 nefrotik sendromun nedeni olduğu ileri sürülmektedir.¹⁴⁵ FSGS genel olarak nefrotik düzeyde proteinüri, glomerüllerin bazılarında(fokal) ve

glomerüler halkanın bir bölümünde (segmental) skleroz ve ayaksı çıkıntılarda silinme ile karakterize bir tablodur. Glomerüler skleroz kapiller çökme(kollapsla) karakterizedir, glomerüler mimari seçilebilirken, skar formasyonunda bazal membran tip 4 kollajenin yerini skar kollajeni tip 3 ve 4 alır ve glomerüler yapı bozulur. FSGS, MDH'dan daha ileri yaşlarda görülür. Böbrek yetmezliği daha sık görülür. Steroide yanıt vermeyen nonselektif proteinüri vardır.¹⁴³

FSGS, primer (idiyopatik) ve sekonder FSGS morfolojik olarak heterojen bir gruptur. FSGS için morfolojik bir sınıflandırma yapılmış ve FSGS (NOS), perihiler, tip, sellüler, çökme (kollapsing) diye 5 varyanta ayrılmıştır.¹⁴⁶

Histopatoloji; skleroz ve hyalin birikimlerle karakterize segmental lezyonlar glomerülün periferinde yer alır, Bowman kapsülü ile glomerüler yumak arasında adezyonlar görülebilir. Segmental lezyonda hipersellülarite glomerüler hücre proliferasyonu şeklindedir. Podosit hücre proliferasyonu sellüler çökme tipinde gözlenen bir bulgudur. Fakat matür podosit özellikleri yoktur. GLEPP-1, WT1, C3b, sinaptopodin, podokaliksin gibi podosit belirleyicilerini eksprese etmezler. Bunların kaybı podosit hasarını gösterebilir. Prolifere hücreler matür podositlerde izlenmeyen sitokeratin ve makrofaj belirleyicisi olan CD68 ekspresyonu gösterebilirler, bu durum paryetal epitel hücreleri ve makrofajların da proliferasyonda rolü olduğunu göstermektedir. Prolifere olan hücreler sklerotik segment üzerinde tek sıra halinde dizilidirler. Hücreler hipertrofik, geniş nükleuslu, belirgin nükleoluslu ve vakuollüdür. Bazal membrandan fokal ayrılmalar sonucu büyük psödokistler görülebilir.¹⁴⁷

Elektron mikroskopik bulgular; en önemli bulgu podosit ayaksı uzantılarında silinmedir. Filtrasyon porlarında yapı bozukluğu, daralma veya genişleme, epitel vakuolizasyonu, mikrovillus oluşumu, ayaksı uzantılarda bazal membrandan ayrılma, bazal membranın bazı alanlarda incilmesi, bazal membranda düzensiz görünüm izlenebilir.¹⁴⁷

Patogenez

İmmunglobulinler ve sitokinler, tekrarlayan FSGS olgularında önemi olan dolaşımsal faktörlerdir. Sitokinlerin glomerüler hasara direkt etkisi bilinmemektedir. Hayvan modellerinde rekürren FSGS'li hastaların serumlarının enjeksiyonu sonrasında proteinüri saptanmıştır.¹⁴⁸ Çökme glomerülopatili

hastaların serumlarının enjeksiyonu, glomerüler çökme, podositlerde şişme ve hipertrofiyle sonuçlanmıştır.¹⁴⁹ Nefrotik sendromlu hastaların plazmalarının insan podosit hücre kültüründe slit diafram proteinlerinde diffüz sitoplazmik yeniden dağılıma neden olduğu gösterilmiştir.¹⁵⁰

Membranöz Nefropati (MN)

MN erişkinde nefrotik sendromun en yaygın sebebidir (%30-40), bazı ülkelerde biyopsi tanılarının üçte birini oluşturur.¹⁵¹ Çocuklarda ise seyrek (% 5). Olguların % 80'i nefrotik sendrom, % 20'si 2 gr/günün altında proteinüri düzeyine sahiptir.

MN esas olarak iki gruba ayrılır: primer (idiyopatik) çoğunu oluşturur (%70) ve sekonder formlar. Sekonder MN hepatit B enfeksiyonuyla, Sistemik Lupus Eritematozus, tiroidit, malignensiler, ve penisilamin ve nonsteroid anti enflamatuar ilaç kullanımıyla birliktelik gösterir.¹⁵² MN podosit hasarına yol açan subepitelyal aralıkta immün komplekslerin gelişimiyle (başlıca immunglobulinler ve kompleman üyeleri C3 ve C5b-9 gibi) karakterizedir. GBM'da kalınlaşmaya ve hücre dışı matriks proteinlerinin üretiminde artışa sebep olur.¹⁵³ Hücrel proliferasyon veya infiltrasyon yoktur. Erkek/kadın oranı 2/1'dir, 4. ve 5. dekadlarda pik yapar.

İmmünfloresan mikroskopide; kapiller duvarda özellikle IgG ile boyanma sık görülür.

Elektron mikroskopide; "subepitelyal immün kompleks birikimi" görülür. Mezangiyal boyanma zayıftır. Primer membranöz glomerülopatinin patogenezi bilinmemektedir. Hastaların %30'unda ağır proteinüri (>10 gr/gün) yapabilir.

Patoloji

Evre I: Işık mikroskopik inceleme : Normaldir.

İmmünfloresan mikroskopik inceleme: IgG ve C3'ün granüler birikimi vardır.

Elektron mikroskopik inceleme: Subepitelyal birikimler ve "ayaksız uzantılarda füzyon" görülür.

Evre II: Subepitelyal birikimler bazal membranın epitelyal yüzünü düzensiz hale getirmiştir. Kapiller duvar kalınlaşmıştır.

Evre III: Kapiller duvarda düzensiz kalınlaşma vardır.

Evre IV: Bazal membranda kalınlaşma artar ve kapiller çökme yerleşir.

Evre V: Glomerüllerin % 10'dan fazlasında global skleroz gelişmiştir.

Hastaların % 80'i nefrotik sendrom bulgularına sahiptir. Mikroskopik hematüri nadirdir. Proteinüri masif düzeyde olabilir, % 80'den fazlası 3 gr/gün ↑.

Olguların % 25-40'ı spontan, % 20-25'inde ise kısmi remisyon bildirilmiştir.

% 10-15 olguda MDH benzeri steroide duyarlı remisyon ve relapslar görülebilir.

10 yıllık takipte olguların % 10-20'inde, 15 yıllık takipte olguların % 30-50'sinde böbrek yetmezliği gelişebilir.

Beck ve arkadaşları M-tip fosfolipaz A2 reseptör (PLA2R) antikor ajanların idiyopatik membranöz nefropatili (MN) hastaların %80'inde bulunduğunu bildirmişlerdir.¹⁵⁴ Podositin hücre yüzeyi üzerinde eksprese olan PLA2R'nin belirlenmesi yeni bir gelişmedir, MN'e sebebiyet veren yaygın bir antijendir. Sıçan model MN (Heyman nefriti) insan MN patolojisine yakından benzer ve podosit hasarının mekanizması çalışmalarında yaygın olarak kullanılmıştır. Bu modelde, ölümcül düzeyin altında kompleman aktivasyonunun çok sayıda hücre içi sinyal yollarını aktive ettiği gösterilmiştir.¹⁵⁵ Podosit kültüründe RhoA sublytic C5b-9'u aktive eder, hücresel uzantıların kaybına sebep olur.¹⁵⁶ Ek olarak, nefrin yeniden dağılımı ve onun aktinden ayrılması Heyman nefritinde proteinüri başlangıcından önce gösterilmiştir.¹⁵⁷

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Araştırmada Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji kliniğine 2005-2011 yılları arasında başvuran ve iğne biyopsisi alınarak incelenmek üzere Histoloji ve Embriyoloji AD Elektron Mikroskopi laboratuvarına gönderilen bloklanmış hasta böbrek dokuları kullanıldı. Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 20.09.2012 tarih ve 2012/322 sayılı Kurul Kararı ile onay alındı.

Membranöz Glomerülonefrit, Minimal Değişiklik Hastalığı, Membranoproliferatif Glomerülonefrit ve Fokal Segmental Glomerüloskleroz klinik tanılı hastalardan beşer hasta içeren dört grup oluşturuldu. Gruplar oluşturulurken Nefroloji Kliniği Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet Kıyıkım'ın çalışılmaya uygun olarak belirlediği hastalar alındı. Kontrol grubu olarak 2005-2011 yılları arası başvuran, glomerüler hasarı bulunmayan tubulointerstisyel nefrit tanısı almış dört hastanın bloklanmış dokuları kullanıldı (Tablo 3).

Dokular bloklanmadan önce, %2,5'lük gluteraldehit ile fikse edilip, 4-6 saat sonra fosfat tamponlu tuz solusyonu ile yıkanıp, osmiyum tetroksitle postfikse edilerek rutin elektron mikroskopik doku takibi sürecine tabi tutulmuştu. Takip süreci biten dokular resine (EMS EMBed-812 DDSA Kat No:13710, ARALDITE 502 Kat No:10900, DMP 30 Kat No:13600) gömülü bloklar halindeydi.

Daha önce doku takibi cihazı (Leica EM TP Leica Microsystems GmbH, Viyana, AVUSTURYA) takibi yapılan, kesit alınan ve değerlendirilen bu plastik bloklardan, ince yapı düzeyinde morfolojik değerlendirme ve immün elektron mikroskopik inceleme için yeniden ultramikrotom (Leica Ultracut UCT 125 ultramikrotom Leica Microsystems GmbH, Viyana, AVUSTURYA) ile önce 2000 nm kalınlığında semithin kesitler alınıp ışık mikroskop (Olympus BX50 Olympus GmbH, Almanya) ile uygun glomerüller bulundu ve 70 nm kalınlığında kesitler, bakır (EMS Kat No:G300-Cu) ve nikel (EMS Kat No:G300 Ni) gridler üzerine alındı. Bakır gridler üzerine alınan kesitler uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlandıktan sonra ve nikel gridler üzerine alınan kesitler immunelektron protokolüne göre boyanıp kontrastlandıktan sonra transmisyon

elektron mikroskop (Jeol Jem-1011, Jeol Ltd, Tokyo, Japonya) ile değerlendirildi. Mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Megaview III, Olympus GmbH, Almanya) ile fotoğraflar çekildi. Fotoğrafların değerlendirilmesinde ve analizinde iTEM 5.0 (Olympus GmbH, Almanya) görüntü analiz programı kullanıldı.

Kullanılan Primer Antikorlar:

- Anti-Nephrin antibody ABCAM (ab 85379) (1/250 dilüsyon)
- Anti-NPHS2 antibody (podocin) ABCAM (ab 82108) (1/50 dilüsyon)
- Anti-CD2AP antibody ABCAM (ab84829) (1/250 dilüsyon)
- Anti-Actin antibody ABCAM (ab95437) (1/250 dilüsyon)
- Anti-P-cadherin antibody ABCAM (ab75718) (1/10 dilüsyon)

Kullanılan Sekonder Antikor: Sekonder 5 nm Anti Rabbit IgG (tüm molekül)-Gold, antibody produced in goat) Sigma Aldrich G7277 Lot: SLBC5796V. Sekonder gold konjuge antikor Anti-Nephrin Ab için 1/100 dilüsyon, diğer primer antikorlar için 1/200 dilüsyonda kullanıldı.

İmmüelektron Mikroskopi Protokolü

İmmüelektron mikroskopik(İEM) işaretlemede, gömme sonrası işaretleme yöntemi (postembedding) kullanıldı.

Kullanılan Tampon Solüsyonların Hazırlanışı:

500 ml trisli tuzlu tampon (TBS) pH:7.4

1. 3.305 g Tris HCl
2. 0.485 g Tris Base
3. 4.5 g NaCl (%0.9 için)
4. 500 ml dH₂O

Tritonlu trisli tuzlu tampon (TBST)

1. 100 ml TBS (pH:7.4)
2. 1 ml Triton X (%10 stok solüsyon)

Prosedür

1. Hidrasyon: Nikel gridler üzerindeki kesitler tritonlu trisli tuzlu tampon (TBST) ile 1x5 dk damlada kesitler aşağı bakacak şekilde yüzdürme ile yıkandı.
2. Antijen Geri Kazanımı: Gridler TBS içinde %0.1'lik olarak hazırlanmış tripsin içinde bekletildi.(37°C de 30 dk)
3. Primer İnkübasyon: Primer antikor (Ab), TBS(pH:7.4) ile hazırlandı, her grid için 50µl solusyon (primer Ab + TBS) kullanıldı. Primer inkübasyon, damlada kesitler aşağı bakacak şekilde yüzdürme yöntemi kullanılarak yapıldı. Buzdolabında +4°C de gece boyunca bekletildi. Kapalı bir kap içerisinde ıslatılmış gazlı bezler kullanılarak nemli kalması sağlandı. Primer inkübasyondan sonra TBS (pH:7.4) ile 2x5 dk kesitler aşağı bakacak şekilde damlada yüzdürülerek yıkandı.
4. Sekonder inkübasyon: Sekonder Ab hazırlanırken vorteks ile karıştırıldı, 1 saat dinlendirildi, en üstteki pembe tabakadan alındı ve TBS (pH:7.4) ile hazırlandı. Her grid için 30µl solusyon (sekonder Ab+TBS) kullanıldı. Oda ısısında 1 saat damlada yüzdürme şeklinde inkübe edildi. Yine kapalı kap içinde ıslatılmış gazlı bezlerle nemli kalmaları sağlandı. Sekonder inkübasyondan sonra TBS ile 2x5 dk, distile su ile 2x5 dk damlada yüzdürme şeklinde yıkandı. Distile su içinde hazırlanmış %2'lik gluteraldehitte 10 dk damlada yüzdürme şeklinde fikse edildi. Distile su ile 2x5 dk damlada yüzdürme şeklinde yıkandı. Solusyonlar değiştirilirken kurutma kağıdı ile kesit olmayan yüzlerinden gridler kurulandı.
5. Kontrastlama: Kesitler metil alkol içinde hazırlanmış %5'lik uranil asetat ile 5 dk kontrastlandı. Distile su ile durulanan kesitler, %2'lik kurşun sitrat ile 5 dk kontrastlandı. Distile su ile durulanan gridler incelemeye hazır hale geldi.

Tablo 3: Hasta Klinik ve Laboratuvar Bilgileri

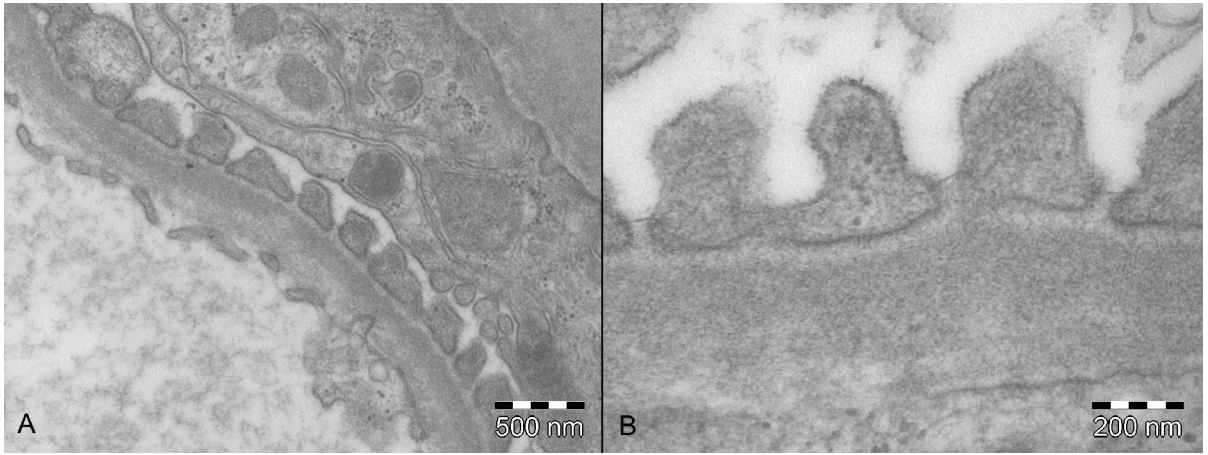
	FSGS Grubu	Membranöz GN Grubu	MDH Grubu	MPGN Grubu	Kontrol Grubu
Hasta Sayısı	5	5	5	5	4
Yaş (Ortalama)	37.4	46.4	51.6	41.4	52.3
Cinsiyet E/K	3/2	4/1	1/4	4/1	3/1
Proteinüri (gr/lt)	2903	1594	1474	798	114
Serum Kreatinin N (< 0.9 mg/dl)	2.37	0.85	0.88	2.87	3.5
Kanda Albumin N (3.4-4.8gr/dl)	2.79	2.63	2.16	3.36	3.8
İmmunfloresan Birikim	-	-	-	IgG, IgA, IgM, C3 +	-
	-	IgG +	-	IgG, IgM, C3 +	-
	IgG, IgA, IgM, C3 +	-	-	IgM +	-
	IgA, IgM +	IgG, IgA, IgM, C3 +	-	-	-
	-	IgG, IgA, IgM, C3 +	-	-	-
Tedavi Yanıtı Tam Remisyon Kısmi Remisyon Yanıtız	Kısmi Remisyon	Tam Remisyon	Tam Remisyon	Tam Remisyon	-
	Yanıtız	Kısmi Remisyon	Tam Remisyon	Kısmi Remisyon	-
	Yanıtız	Kısmi Remisyon	Tam Remisyon	Yanıtız	-
	Yanıtız	Kısmi Remisyon	Tam Remisyon	Tam Remisyon	-
	Yanıtız	Tam Remisyon	Tam Remisyon	Kısmi Remisyon	-

BULGULAR

TEM ile tesbit edilen morfolojik bulgular

Kontrol Grubu

Kontrol grubunda yer alan hastaların morfolojik değerlendirmesinde; glomerülün genel yapısı ve kapiller halkalar doğal görünümdeydi. Podosit hücre gövdelerinin normal görünümde olduğu, primer uzantıların yapılarının düzgün görüldüğü tesbit edildi. Podosit ayaksı uzantılarının glomerüler kapillerleri sardığı, GBM'da podosit ayrılma alanlarının ve dejenere alanların bulunmadığı görüldü (Resim 3A). Filtrasyon yarıkları genel olarak düzgün yapıdaydı (Resim 3B). Filtrasyon yarıklarının çoğunda slit diaframlar izlenebiliyordu (Resim 3B). Bazal membran kalınlaşması izlenmedi, kıvrılma, duplikasyon gibi bulgulara rastlanmadı (Resim 3A). Mezangiyal alanda hücre ve matriks artışı görülmeydi. Podositler içerisinde vakuol, psödokist gibi oluşumlar izlenmedi. Yer yer bazal ve apikal invaginasyonlar görüldü. Endositotik veziküllere de rastlandı. Endotel hücresi doğal görünümdeydi. Ayaksı uzantılar arasında desmozom benzeri sıkı bağlantı yapıları görülmeydi.

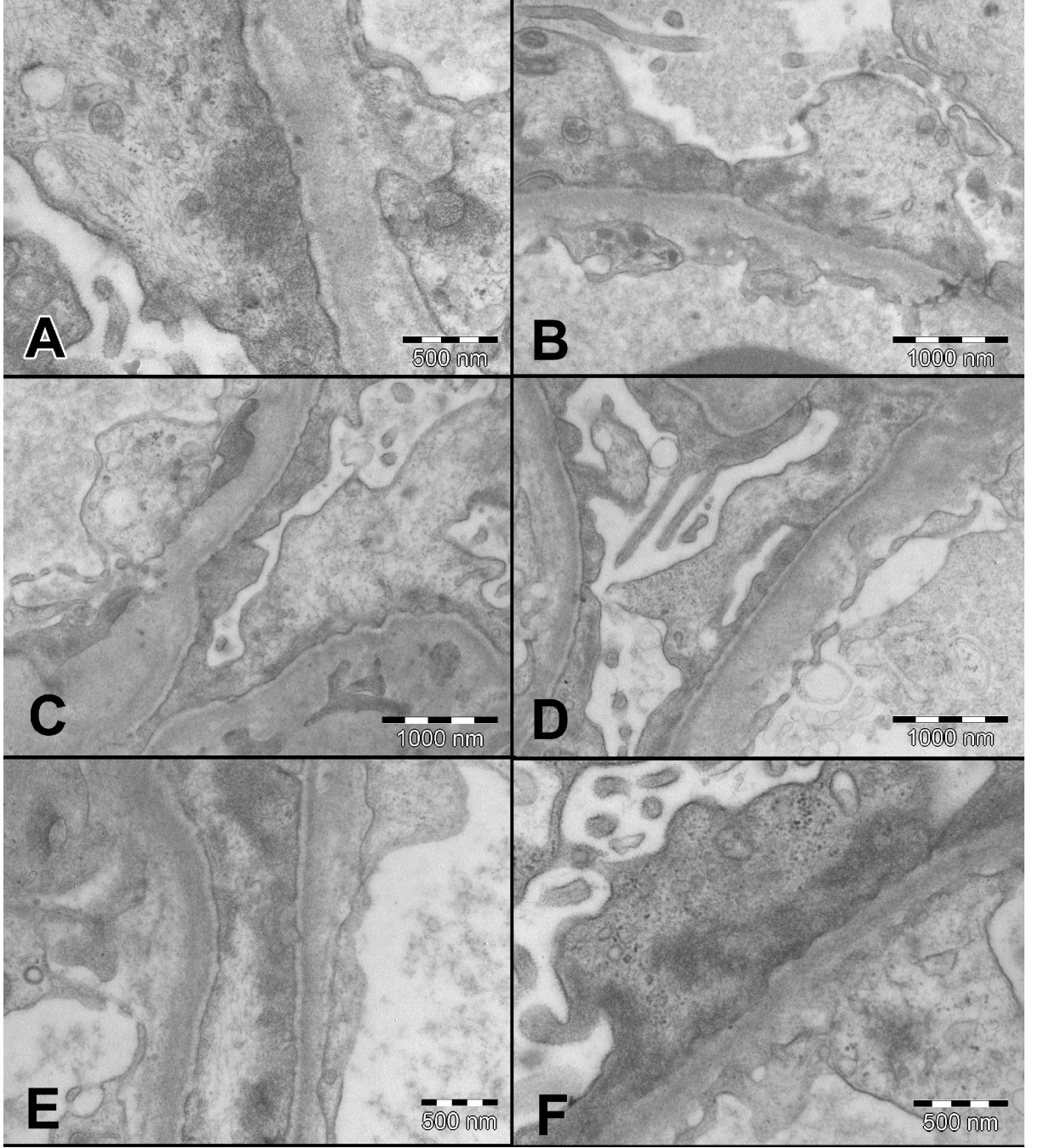


Resim 3: Kontrol Grubu TEM. (Uranil asetat-kurşun sitrat, A: X40.000, B: X100.000)

Minimal Değişiklik Hastalığı (MDH) Grubu

Glomerülün genel yapısı doğala yakın görünmekle birlikte, geniş alanlar boyunca podosit ayaksı uzantılarında (pedisel) düzleşme izlendi (Resim 4A,C). Açık kalmış filtrasyon yarığı sayısı oldukça azdı. Düzleşme alanlarında bant şeklinde aktin yoğunlaşması olduğu gözlemlendi (Resim 4E,F). Bu alanlarda filtrasyon yarıklarının birçoğunun daralmış, hatta kapanmış olduğu görüldü (Resim 4B,C,F). Bu şekilde olan filtrasyon yarıklarının bir kısmında desmozom benzeri sıkı bağlantılar oluştuğu gözlemlendi. Bu yapılar diğer hasta gruplarında da görülse de, en fazla minimal değişiklik hastalığı tanısı alan hastalarda belirlendi. Bu bağlantıların bazıları plak şeklini almıştı. Çok sayıda bazal invaginasyon görüldü. Endositotik veziküller izlendi. Düzleşmenin olmadığı bölgelerde normal yapıda filtrasyon yarıkları görüldü, az sayıda filtrasyon yarığında slit diaframlar belirlendi.

GBM genel olarak düzgün ve düzenliydi, kalınlaşma yoktu (Resim 4B,D). İki hastada intramembranöz granüler birikim izlendi. Bir hastada mezangiyal hücre proliferasyonu ve matriks artışı vardı, duplikasyon alanları oluşmuştu. Bir hastada GBM üzerinde podosit kaybının olduğu bir alan bulunuyordu. İki hastada podositlerin aktif olduğu, vakuol oluşturacak şekilde GER genişlemesi bulunduğu görüldü.



Resim 4: MDH Grubu TEM. (Uranil asetat-kurşun sitrat A: X50.000, B: X30.000, C: X30.000, D:X30.000, E: X40.000, F: X50.000).

Membranöz Glomerülonefrit (MN) Grubu

Bu hasta grubunda podosit ayakları uzantılarının incelemesinde, filtrasyon yarığı sayısının azaldığı görüldü. Görülebilen SD sayısı da azdı (Resim 5C,F). Bazı hastalarda yaygın pedisel düzleşmesi izlendi. Belirgin subepitelyal granüler birikimler görüldü (Resim 5A,B). Podosit sitoplazmasının bu birikim alanlarının yakın komşuluğundaki bölgelerinde belirgin aktin yoğunlaşması saptandı. Aktin

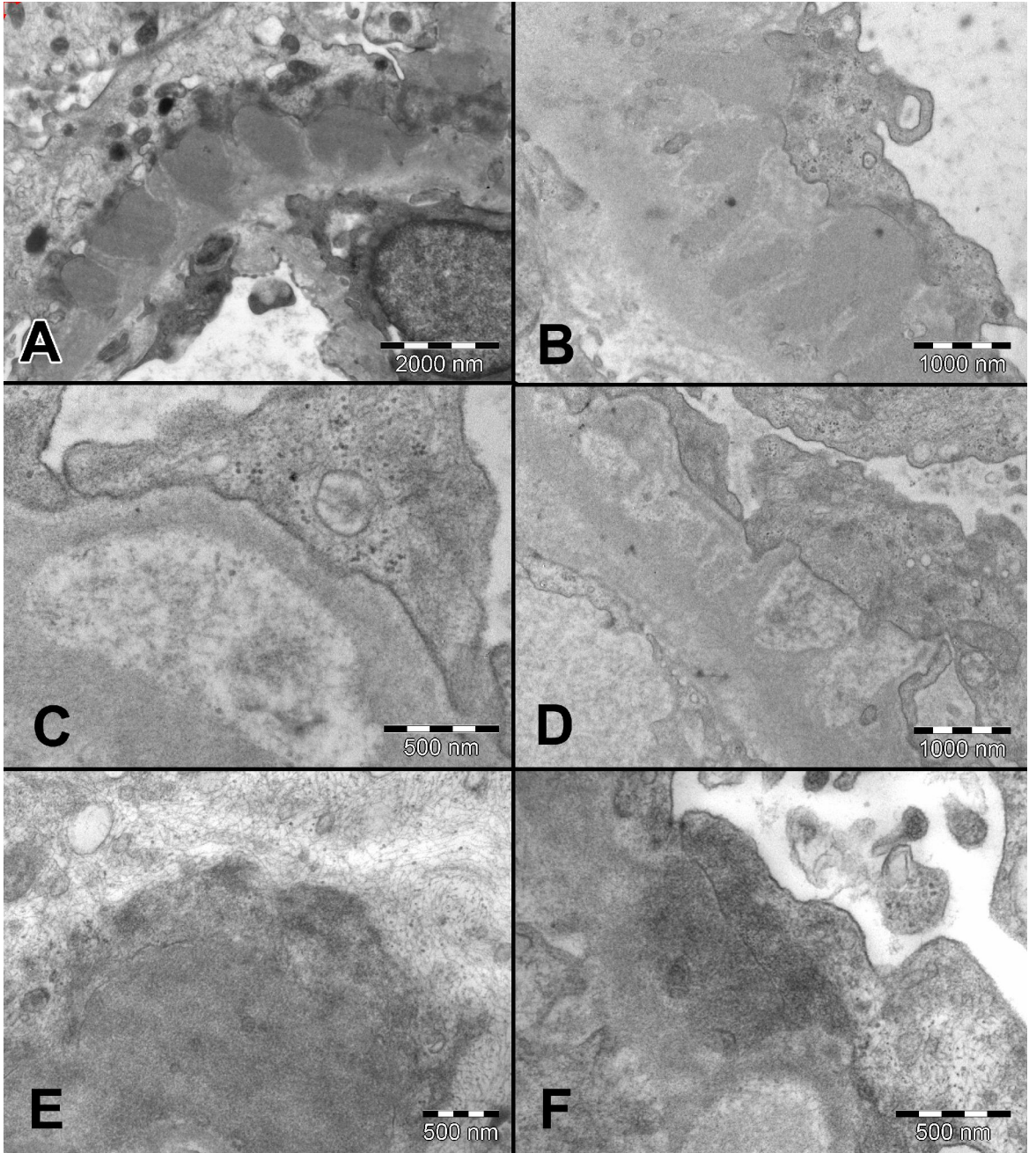
yoğunlaşmasının birikim alanlarını adeta bir şapka gibi sardığı belirlendi (Resim 5E,F). Birikimlerle aktin yoğunlaşması ilişkisinin çok belirgin olduğu görüldü (Resim 5E,F). Birikimin olmadığı bölgelere komşu podosit sitoplazmasında aktin yoğunlaşması da izlenmedi. Bu bölgelerde, podositin iyi durumda olduğu ve SD'ın normal olarak izlendiği saptandı.

Membranöz nefropatide hastalığın dört patolojik evresi bulunmaktadır. Bu çalışmada, supepitelyal birikim ve aktin yoğunlaşmasının evre II de belirgin olduğu, evre III ve IV de birikimin rezorbe olduğu, aktin yoğunlaşmasının da azaldığı görüldü (Resim 5C,D). Bazı hastalarda mezangiyal hücre proliferasyonu görüldü. Bazal membranda kalınlaşma ve duplikasyon belirlendi (Resim 5B). Bazı hastalarda podosit içinde vakuoller izlendi (Resim 5A). Bir hastada endotel hücrelerinin çok şiştiği, neredeyse lümeni kapladığı, diğer bir hastada glomerül içinde bağ dokusu (kollajen lifler) artışı olduğu görüldü. Bazı hastalarda filtrasyon yarığı sayısı ve yapısının daha iyi olduğu izlendi, bunlarda SD da daha yoğun olarak gözlendi. Aktin yoğunlaşmasının minimal değişiklik hastalığına göre belirgin şekilde fazla olduğu görüldü. Filtrasyon yarığı sayısı minimal değişiklik hastalığı grubuna göre daha fazlaydı. Ancak filtrasyon yarıklarının genel yapısı bozuktu, çoğunlukla daralmıştı ve bir çoğunda SD görülmüyordu. Bazı daralmış filtrasyon yarıklarının kenarlarında filamentöz materyal benzeri yapılar dikkati çekti. Çok nadir bazı alanlarda GBM'dan ayrılma gözlendi. Birkaç alanda bazal invaginasyon ve endositotik vezikül de gözlendi.

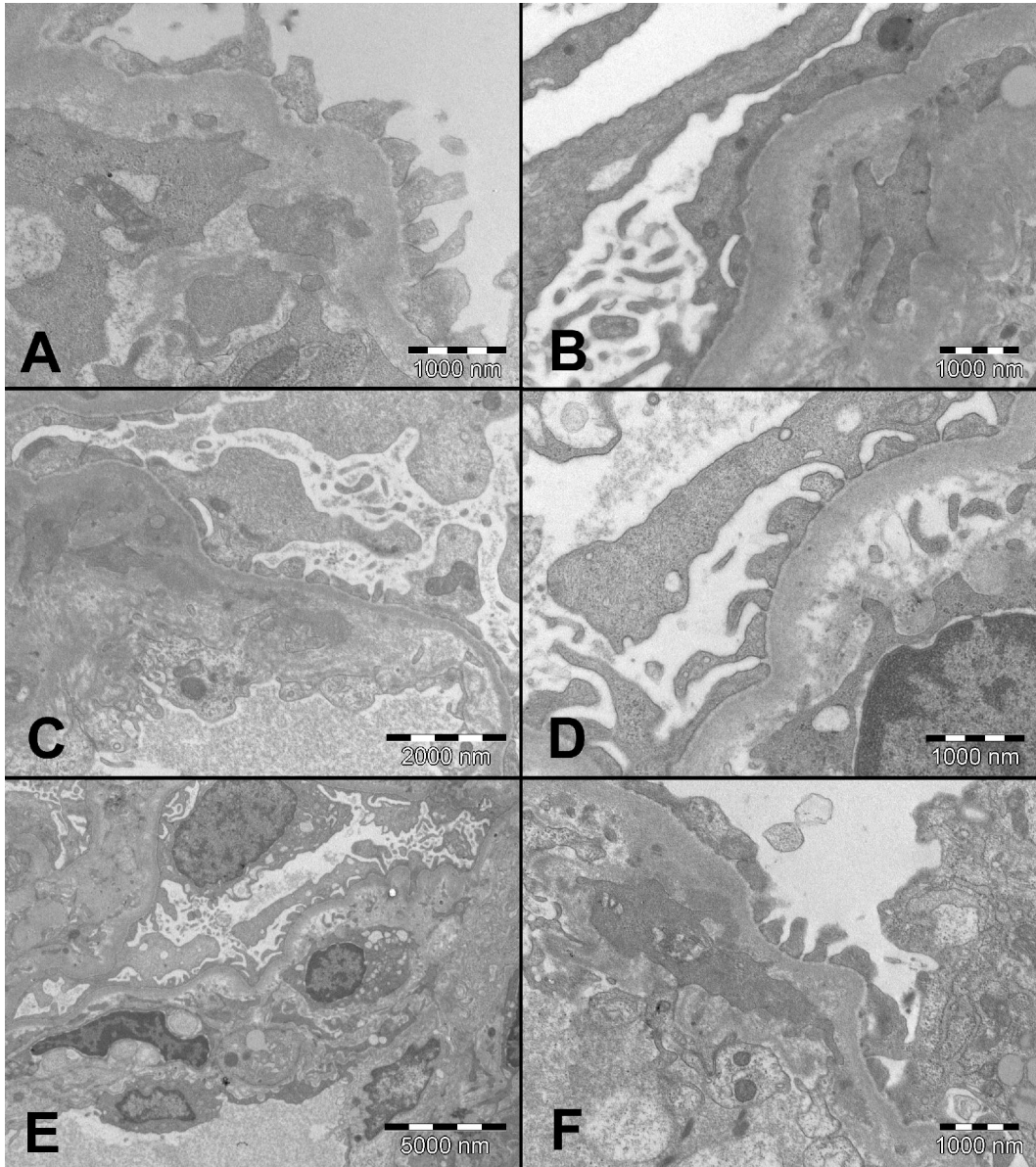
Membranoproliferatif Glomerülonefrit (MPGN) Grubu

Hastaların çoğunda mezangiyal alanın genişlediği, mezangiyal hücre proliferasyonu ve matriks artışı olduğu, bazal membranda çok belirgin şekilde düzensizlik ve kıvrılma alanlarının bulunduğu görüldü, belirgin duplikasyon görüntüleri izlendi (Resim 6A,C,E). Bazal membranda dejenere hücre parçacıkları bulunan alanlar vardı (Resim 6D). Pedisellerde düzleşme alanlarının olduğu ve bu alanlarda aktin yoğunlaşmasının olduğu belirlendi. Aktin yoğunlaşmasının ara ara bazı bölgelerde bant şeklinde olduğu saptandı (Resim 6B). Bazı hastalarda çok miktarda intramembranöz birikim vardı. Bu grupta desmozom benzeri yapı nadiren görüldü.

Genel olarak MPGN hastalarında mezangiyal alanın çok genişlediği ve esas patolojik bulguların bu bölgede gözlendiği belirlendi (Resim 6C). Ancak bütün bu karışık ve kalabalık görüntüye rağmen, filtrasyon yarıkları ve podosit genel yapısı oldukça iyi görünüyordu (Resim 6D,E). Çalışılan hasta grupları arasında normal yapıda filtrasyon yarığı ve SD'a en fazla MPGN grubunda rastlandı. Normal görünen çok sayıda filtrasyon yarığı ve SD'lar bulunuyordu. Az sayıda rezorbe olmaya başlamış birikim alanı görüldü. Bir, iki küçük alanda podositte incelleme ve kayıp saptandı. Bazal invaginasyonlar görüldü.



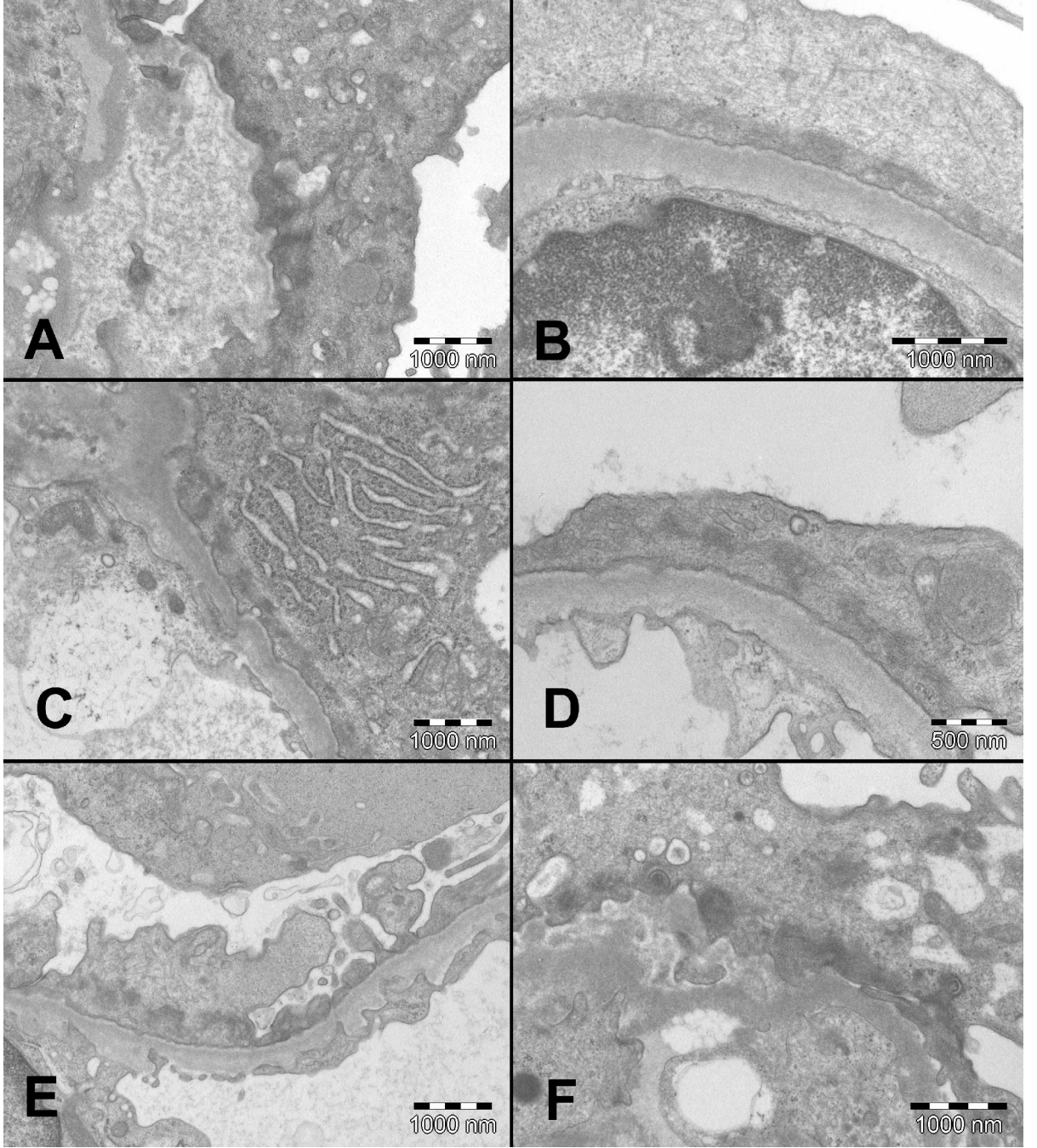
Resim 5: Membranöz GN Grubu TEM. (Uranil asetat-kurşun sitrat A: X15.000, B: X25.000, C: X60.000, D: X25.000, E: X40.000, F: X60.000).



Resim 6: MPGN Grubu TEM. (Uranil asetat-kurşun sitrat A: X25.000, B: X20.000, C: X15.000, D: X25.000, E: X6.000, F: X20.000)

Fokal Segmental Glomerüloskleroz (FSGS) Grubu

Tüm hastalarda pedisel düzleşme alanları görüldü, bunların üzerinde aktin yoğunlaşma alanları vardı ve bazı bölgelerde düğüm ya da plak görüntüsü oluşturmuş şekilde izlendi (Resim 7A,D,F). FSGS'li hastalarda düzleşmiş pedisellerde aktin yoğunlaşması membranoproliferatif glomerülo nefritli hastalardan daha fazlaydı. Bir hastada aktin yoğunlaşmasının bant şeklinde olduğu belirlendi (Resim 7B). Mezangiyal alanda mezangiyal hücre ve matriks artışı vardı (Resim 7C). Bazal membranda belirgin düzensizlik vardı, duplikasyon oluşmuştu (Resim 7A,F). Bazal membranda bazı yerlerde hem iç, hem dış kontur düzensizliği görüldü. GBM'da kıvrılma alanları da görüldü, bu alanların üzerinde aktin yoğunlaşması vardı (Resim 7A,F). Bazı hastalarda subepitelyal granüler birikim alanları görüldü, üzerindeki ayaksız uzantılarda düğüm şeklinde aktin yoğunlaşması vardı (Resim 7F). Bazı podositler içinde fagositik materyal içeren vakuoller görüldü (Resim 7A). Bazı podositlerde psödokist oluşumu belirlendi, ayrıca hipertrofik podositler de izlendi (Resim 7C). Bazı glomerüllerin tümünün ya da bir kısmının dejenere olduğu, hücrelerin izlenmediği; bazı alanlarda ise podosit yapısının gayet normal olduğu, normal yapıda filtrasyon yarıkları ve SD'lar olduğu görüldü. Bazı podositlerde tümüyle normal görülen ara filamanlar ve aktin filamanlar izlendi. Birkaç yerde GBM'dan ayrılma alanı ve podosit kaybı görüldü.



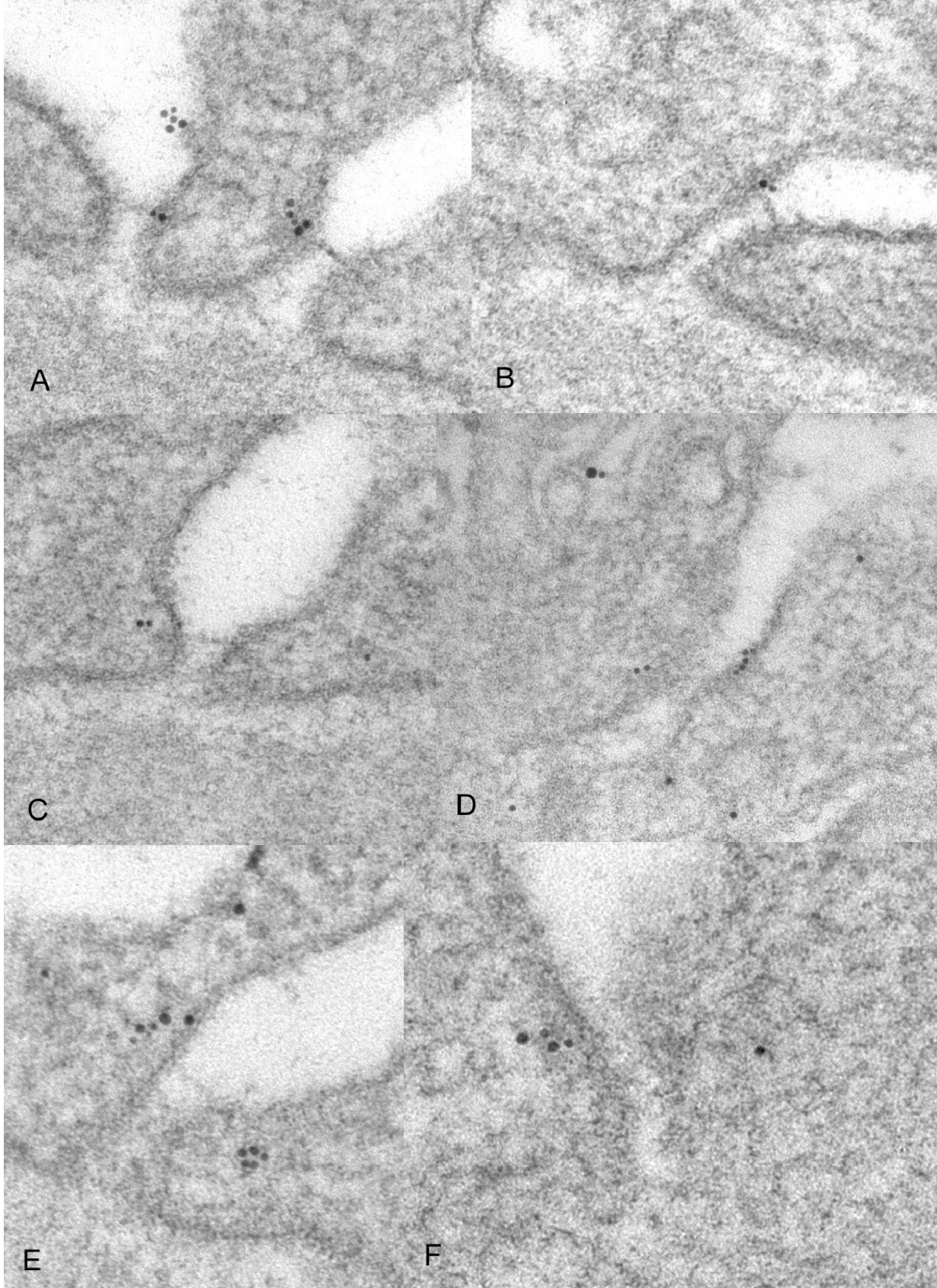
Resim 7: FSGS Grubu TEM. (Uranyl asetat-kurşun sitrat A: X20.000, B: X30.000, C: X20.000, D: X40.000, E: X20.000, F: X25.000).

İMMUN ELEKTRON MİKROSKOPİK (IEM) EKSPRESYON BULGULARI

Nefrin IEM Ekspresyon Bulguları

Kontrol Grubu: Kontrol grubu hastalarında podosit ayakları uzantılarının ve filtrasyon yarıklarının normal yapıda olduğu, çok sayıda slit diaframın görüldüğü

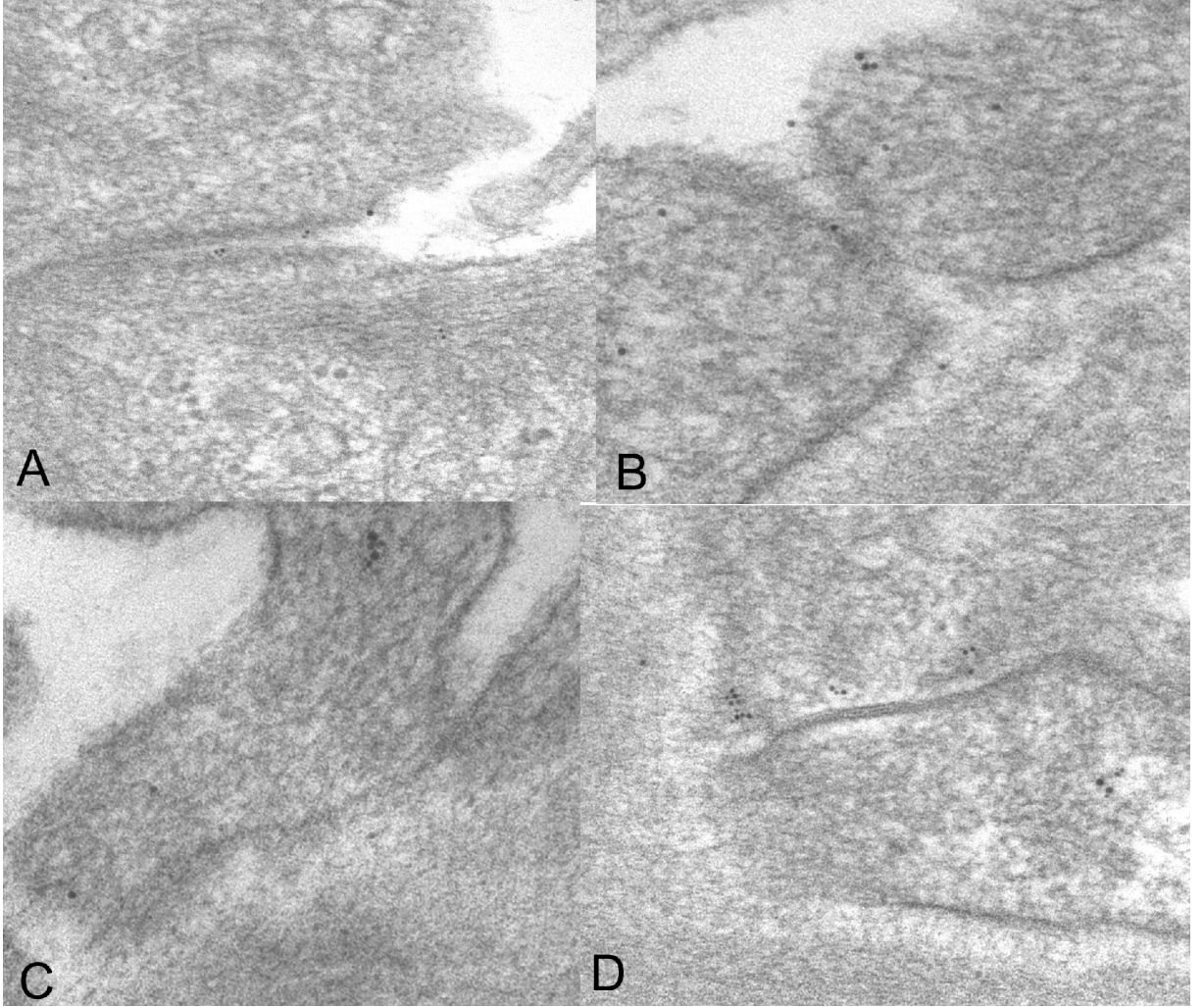
belirlendi. Podosit ayakları uzantılarında intrasitoplazmik bölgede, SD üzerinde ve çevresinde çok miktarda nefrin ekspresyonu gözlemlendi (Resim 8A,B,C,D,E,F).



Resim 8: Kontrol Grubu Nefrin Ekspresyonu (A: X200.000, B: X200.000, C: X150.000, D: X250.000, E: X200.000, F: X200.000).

Minimal Değişiklik Hastalığı (MDH) Grubu: Geniş düzleşme alanlarında filtrasyon yarıklarının çoğu kapanmıştı, bu bölgelerde nefrin işaretlenmesi genellikle azalmıştı. Ancak kapanmaya ve desmozom benzeri sıkı bağlantılar

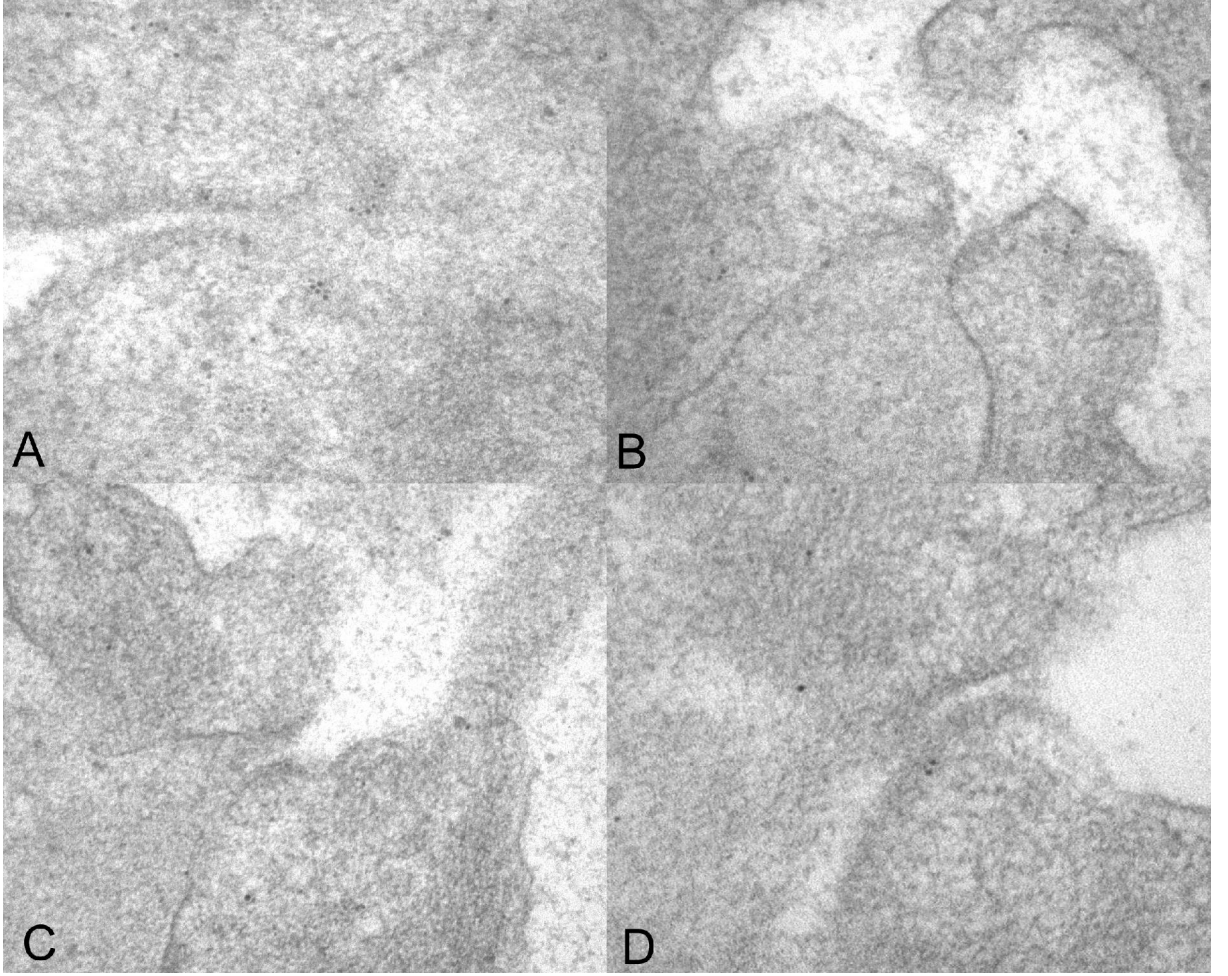
oluşmasına rağmen, bu bölgelerin bir kısmında nefrin işaretlenmesi görüldü. Filtrasyon yarıklarının bir kısmında nefrin işaretlenmesi apikale yer değiştirmişti. Açık filtrasyon yarıklarında görünen SD'lar üzerinde ve ayaksı uzantılarda intrasitoplazmik nefrin işaretlenmesi izlendi. Bazı ayaksı uzantıların bazal kısmında da işaretlenme görüldü. Ancak nefrin ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığı belirlendi (Resim 9A,B,C,D).



Resim 9: MDH Grubu Nefrin Ekspresyonu (A: X120.000, B: X120.000, C: X150.000, D: X120.000).

Membranöz Glomerülonefrit (MN) Grubu: Nefrin işaretlenmesi kontrole göre azalmıştı. Açık ve sağlam olan filtrasyon yarıklarında SD çevresinde nefrin işaretlenmesi görüldü. Ayaksı uzantılarda intrasitoplazmik nefrin işaretlenmesi de izlendi. Normal yapısı bozulmuş bazı filtrasyon yarıklarında, apikalde veya bazal membrana yakın alanlarda nefrin işaretlenmesinin azalmış da olsa bulunduğu görüldü. Bazı subepitelyal birikim alanlarına komşu ayaksı

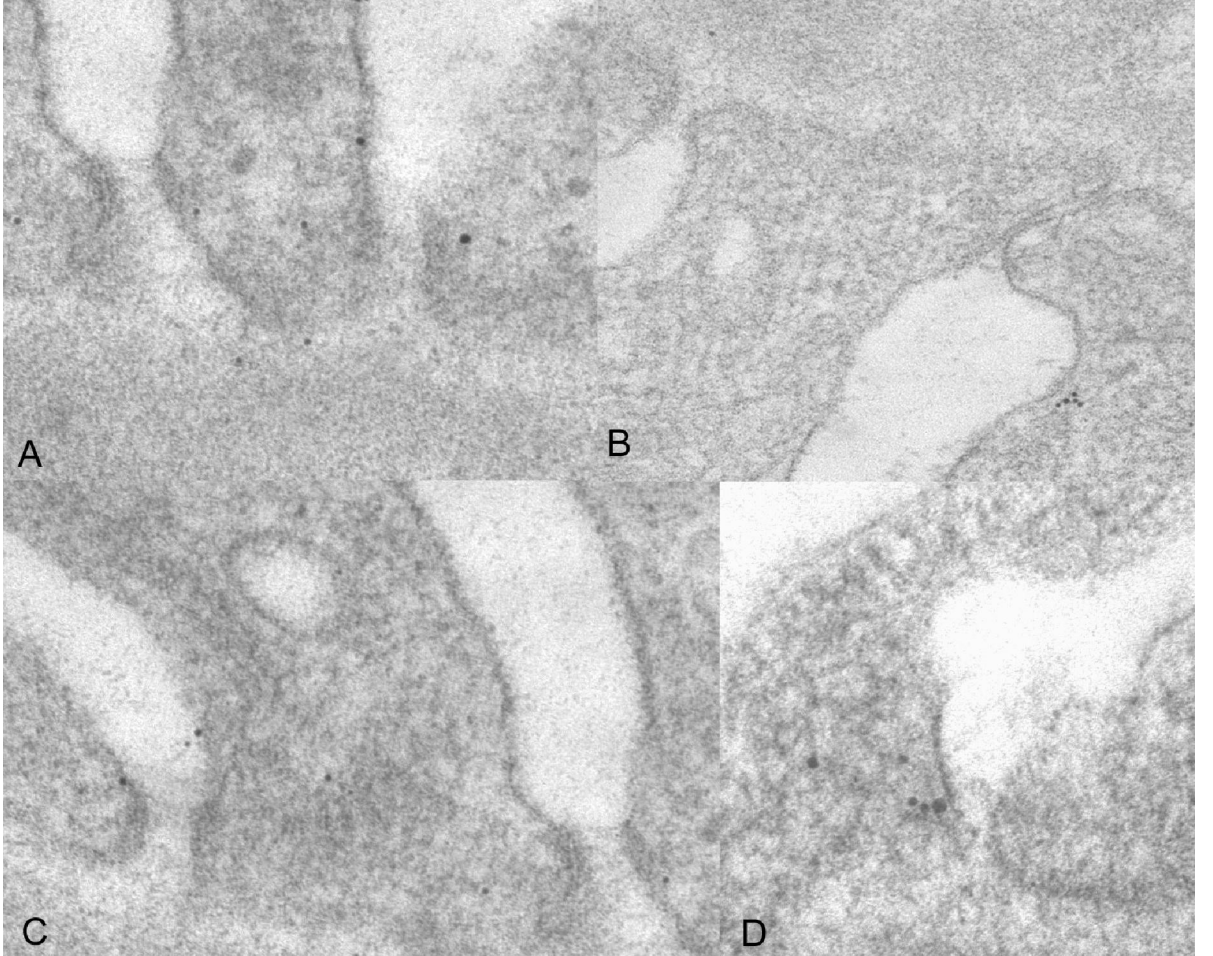
uzantıların bazal bölgesinde nefrin işaretlenmesi görüldü. Minimal değişiklik hastalığı grubuna göre nefrin ekspresyonu oldukça azalmış olarak değerlendirildi (Resim 10A,B,C,D).



Resim 10: Membranöz GN Grubu Nefrin Ekspresyonu (A: X150.000, B: X150.000, C: X120.000, D: X120.000).

Membranoproliferatif Glomerülonefrit (MPGN) Grubu: Filtrasyon yarığı sayısı ve görülen normal slit diafram sayısı minimal değişiklik hastalığı ve membranöz nefropati grubuna göre daha fazla olarak değerlendirildi. Çok sayıda açık filtrasyon yarığı görüldü bunlardan bir kısmında nefrin ekspresyonu saptandı. Ayaksı uzantılarda intrasitoplazmik nefrin işaretlenmesi görüldü. Birkaç yerde sıkı bağlantı benzeri oluşum ve yakınında nefrin işaretlenmesi gözlemlendi. Genel olarak kontrol grubuna göre nefrin işaretlenmesinin belirgin olarak azaldığı belirlendi (Resim 11A,B,C,D).

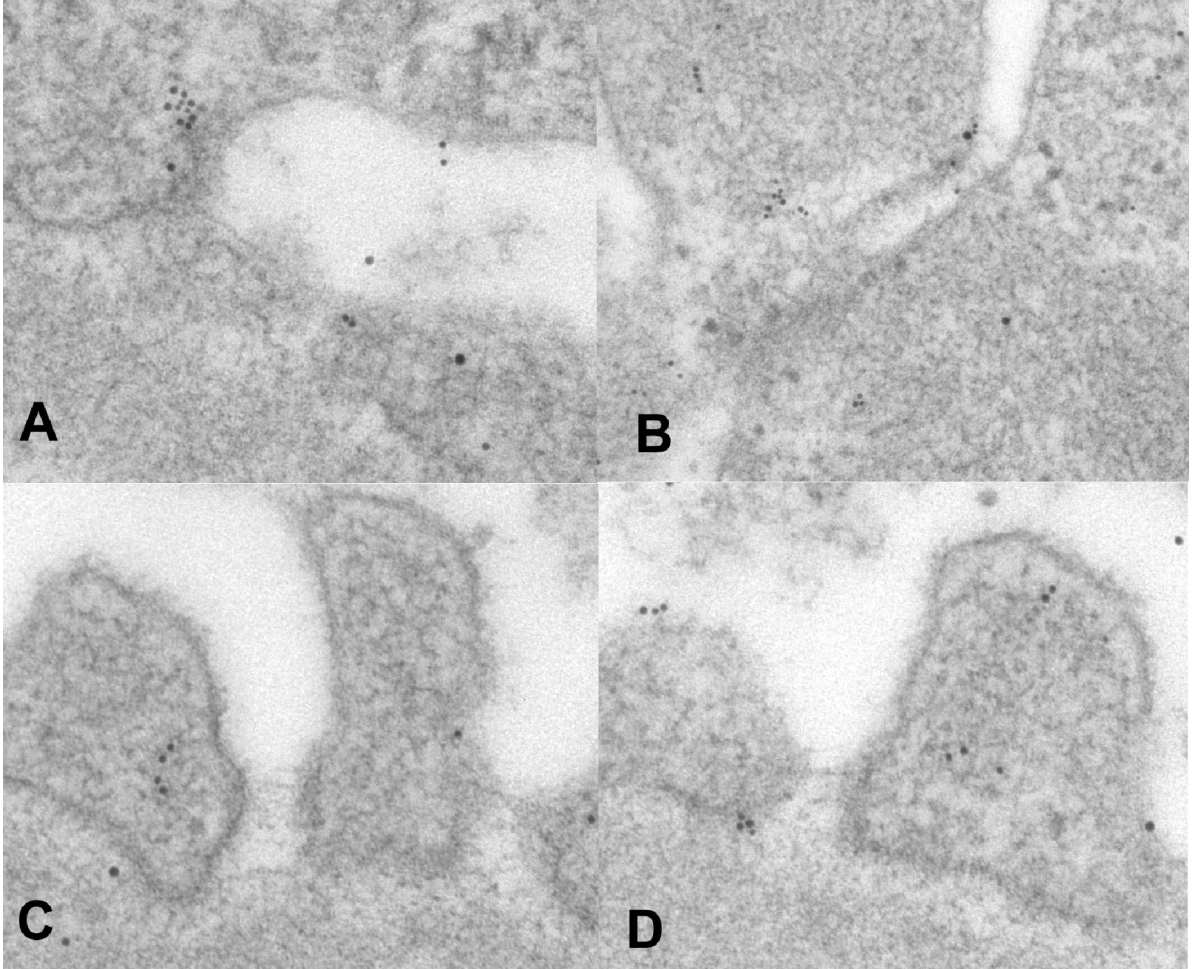
Fokal Segmental Glomerüloskleroz (FSGS) Grubu: Genel olarak filtrasyon yarıklarının yapısı minimal değişiklik hastalığı ve membranöz glomerülo nefrit grubuna göre daha düzgündür, bu filtrasyon yarıklarında ayaksız uzantılar içinde ve SD'lar üzerinde nefrin işaretlenmesi görüldü. Bazı alanlarda pedisel düzleşmesi olduğu, bu alanlarda filtrasyon yarıklarının yapısının bozulduğu, daraldığı veya kapandığı izlendi. Buralarda nefrin işaretlenmesinin oldukça azaldığı görüldü. Bazı bölgelerde bağlantı komplekslerinin oluştuğu, bunların hemen yakınında nefrin işaretlenmesi olduğu saptandı. Glomerülün patolojik bölgesinde yer alan filtrasyon yarıklarının yapısının dejenere olduğu ve bu alanlarda işaretlenmenin olmadığı belirlendi. FSGS'li hasta grubunda nefrin işaretlenmesinin kontrol grubuna göre azaldığı, membranöz nefropati grubuna göre ise arttığı izlendi (Resim 12A,B,C,D,E,F).



Resim 11: MPGN Grubu Nefrin Ekspresyonu (A: X120.000, B: X150.000, C: X120.000, D: X200.000).

Aktin IEM Ekspresyon Bulguları

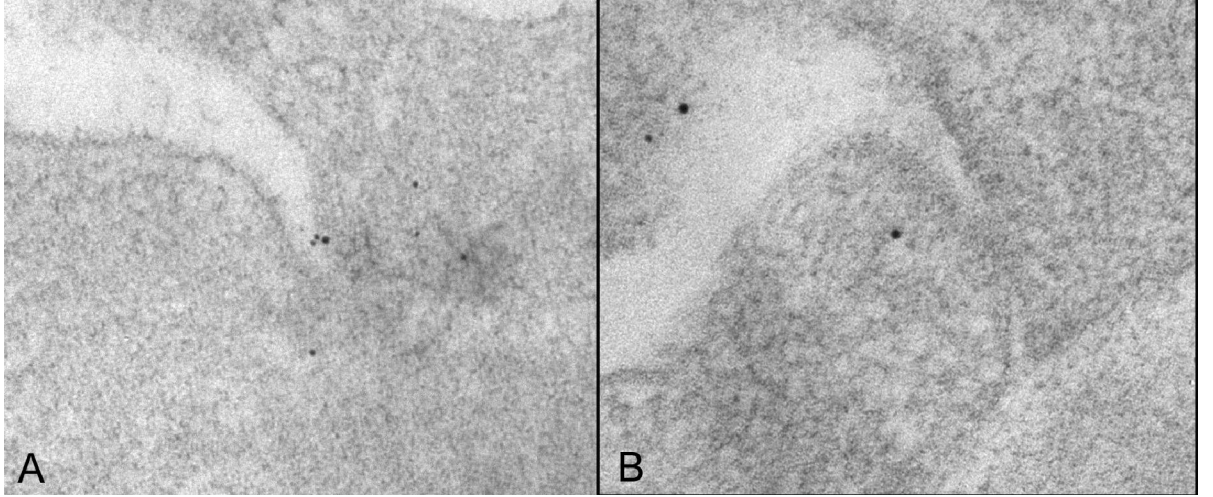
Kontrol Grubu: Podosit hücre gövdesi ve ayakları uzantıları içinde aktin işaretlenmesi görüldü (Resim 13A,B,C,D).



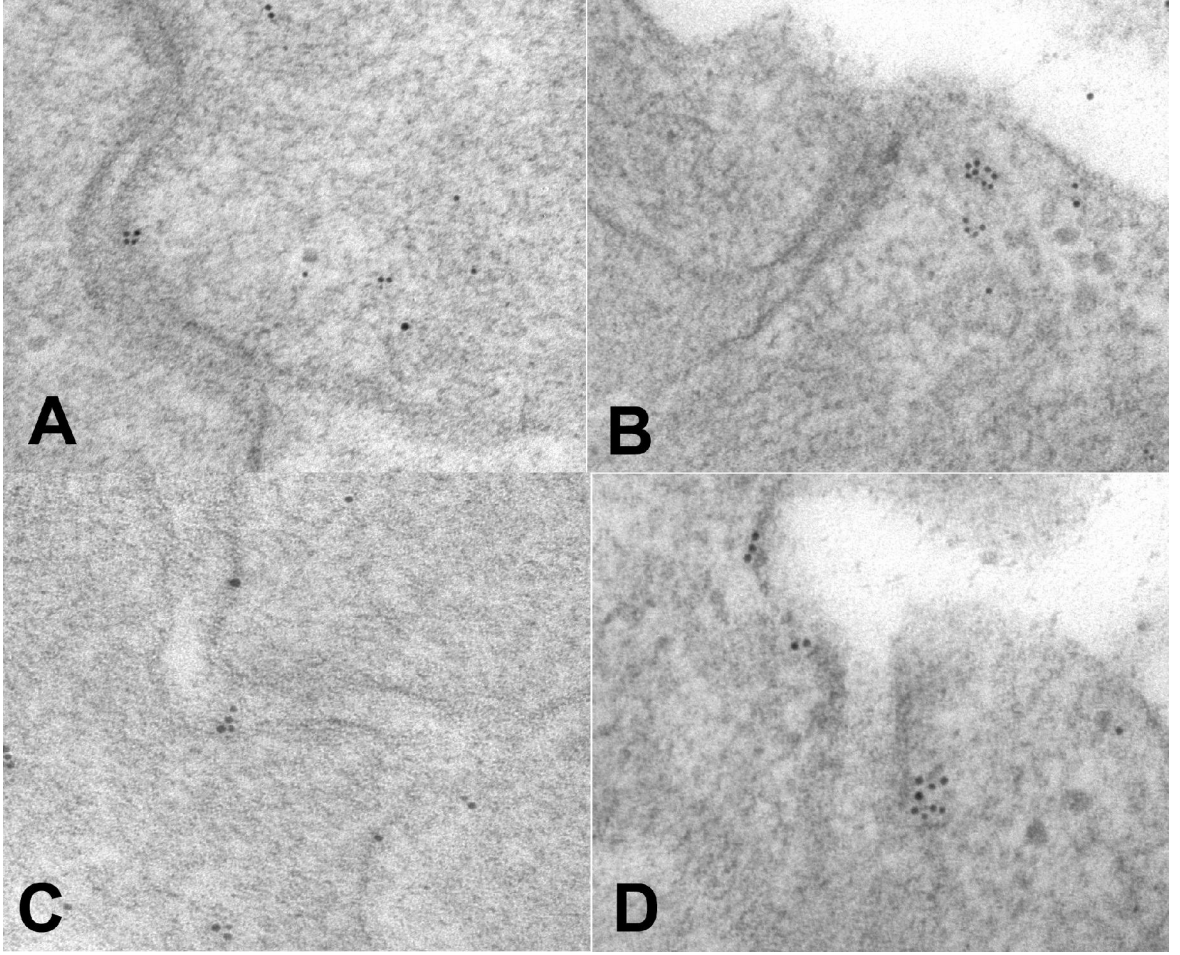
Resim 13: Kontrol Grubu Aktin Ekspresyonu (A: X150.000, B: X150.000, C: X150.000, D: X150.000).

Minimal Değişiklik Hastalığı (MDH) Grubu: Aktin işaretlenmesinin kontrol grubu ile benzer, hatta bir miktar artmış olduğu izlendi. Geniş düzleşme alanlarında, daralmış veya kapanmış filtrasyon yarıklarına yakın bölgelerde daha yoğun olmak üzere aktin işaretlenmesi izlendi. Ayakları uzantılarının bazal membrana yakın bölgelerinde de aktin işaretlenmesi görüldü. Desmozomal yapılar izlendi, bunların bazılarının yakınlarında aktin işaretlenmesi saptandı. Filtrasyon yarıklarının kenarlarında filamentöz materyal ve bazal invaginasyonlar gözlemlendi (Resim 14A,B).

Membranöz Glomerülonefrit (MN) Grubu: Minimal değişiklik hastalığı grubuna göre daha fazla aktin ekspresyonu görüldü, işaretleme kontrole göre de artmıştı. Podositte, ayaklı uzantılar içinde SD'a yakın bölgelerde aktin işaretleme gözlemlendi. Birkaç bölgede desmozomal sıkı bağlantı gözlemlendi, bunların bazılarında aktin işaretleme de belirlendi (Resim 15A,B,C,D).

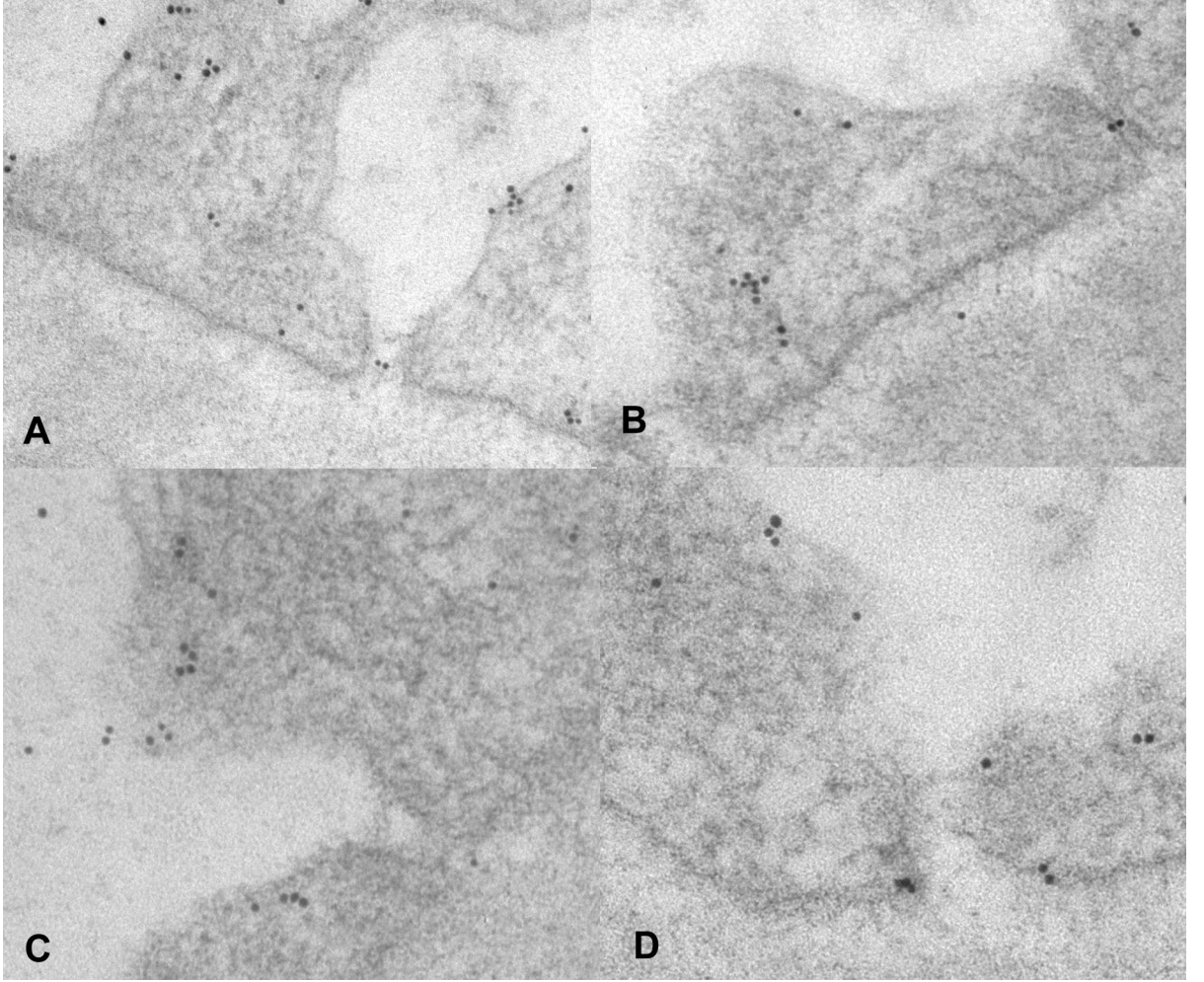


Resim 14: MDH Grubu Aktin Ekspresyonu (A: X120.000, B: X150.000).



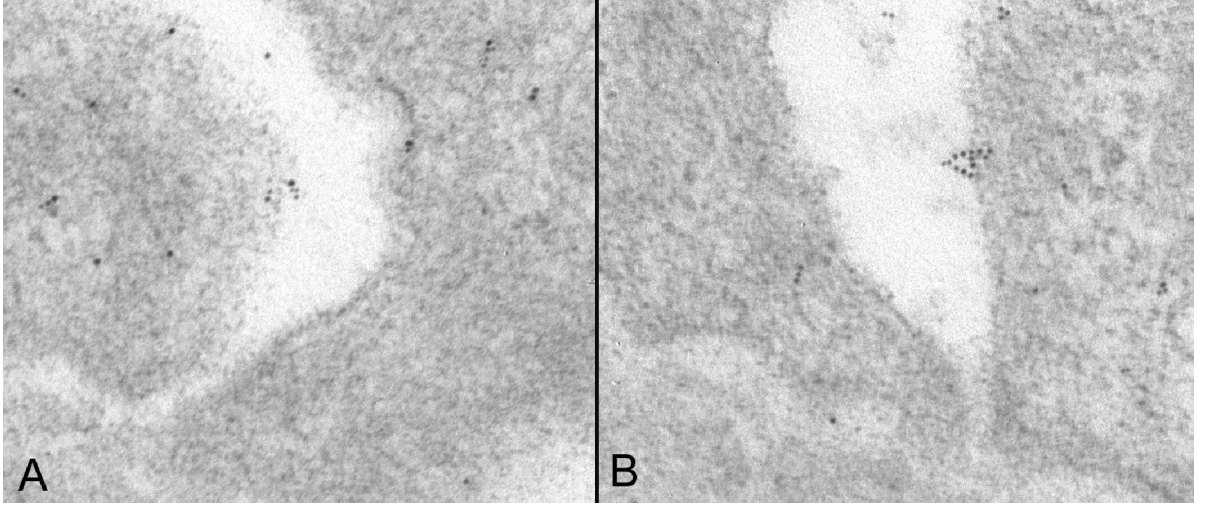
Resim 15: Membranöz GN Grubu Aktin Ekspresyonu (A: X150.000, B: X150.000, C: X150.000, D: X200.000).

Membranoproliferatif Glomerülonefrit (MPGN) Grubu: Genel yapı diğer iki hasta grubuna göre (MDH ve MN) daha iyiydi, düzleşme daha az, açık filtrasyon yarığı sayısı daha çoktu ve bunlarda aktin işaretlenmesi daha fazla görüldü. Yine birkaç desmozomal plak görüldü, yakınında aktin işaretlenmesi vardı. MPGN hastalarında aktin işaretlenmesinin kontrol grubuna göre arttığı ve incelenen hasta grupları arasında en fazla işaretlenmenin bu grupta olduğu saptandı (Resim 16A,B,C,D).



Resim 16: MPGN Grubu Aktin Ekspresyonu (A: X150.000, B: X150.000,C: X150.000, D: X150.000).

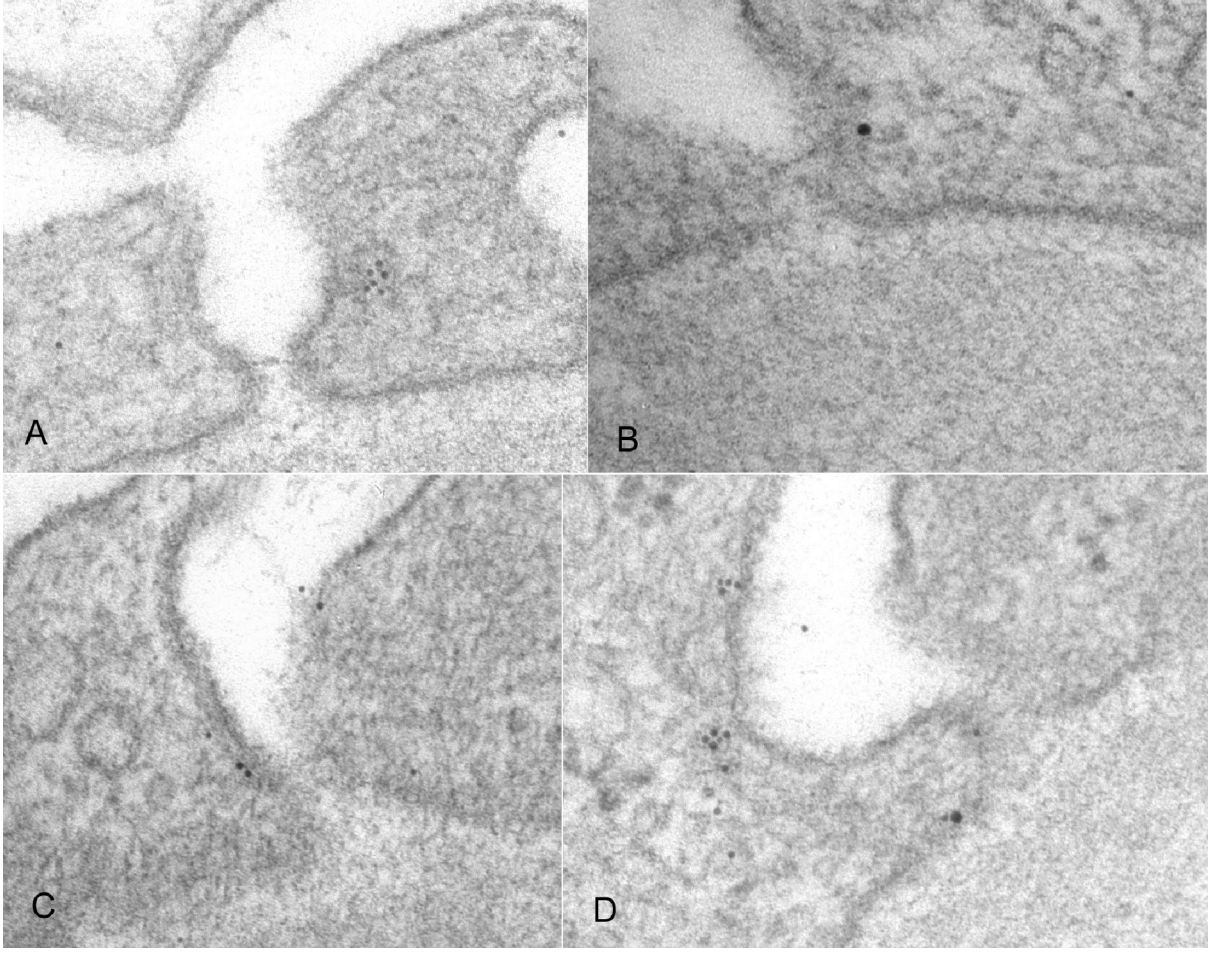
Fokal Segmental Glomerüloskleroz (FSGS) Grubu: Ayaksı uzantılarda aktin işaretlenmesi görüldü. Aktin yoğunlaşmasının olduğu alanlarda aktin işaretlenmesi de vardı. Bazı alanlarda bazal membrana yakın bölgelerde aktin işaretlenmesi görüldü. Hasta grupları arasında aktin işaretlenmesinin en az olduğu grup FSGS grubu olarak belirlendi (Resim 17A,B).



Resim 17: FSGS Grubu Aktin Ekspresyonu (A: X100.000, B: X100.000).

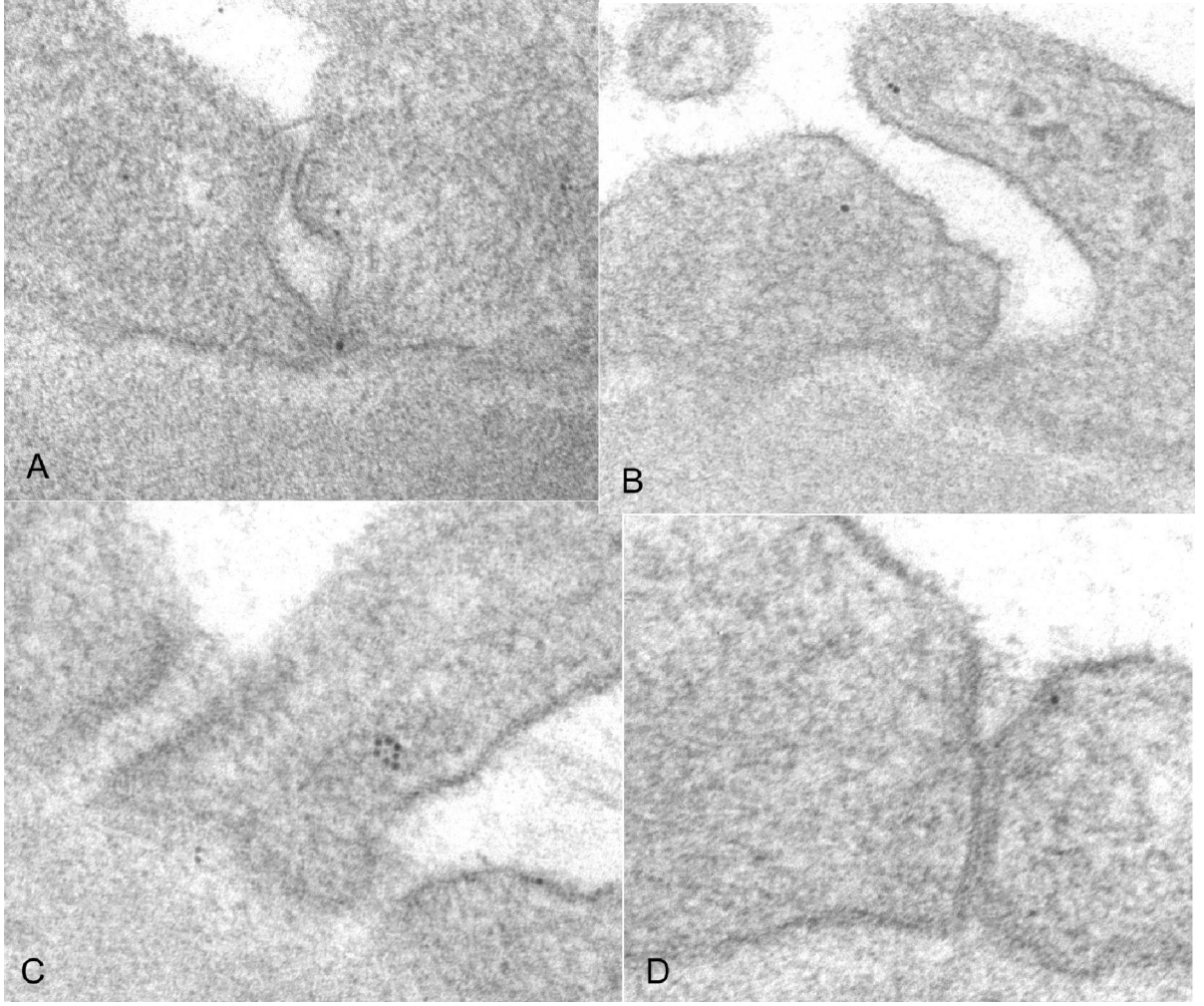
CD2AP IEM Ekspresyon Bulguları

Kontrol Grubu: Ayaksı uzantılarda intrasitoplazmik CD2AP işaretlenmesi görüldü. İşaretlenme nefrin ekspresyonuna göre daha az olarak değerlendirildi (Resim 18A,B,C,D).



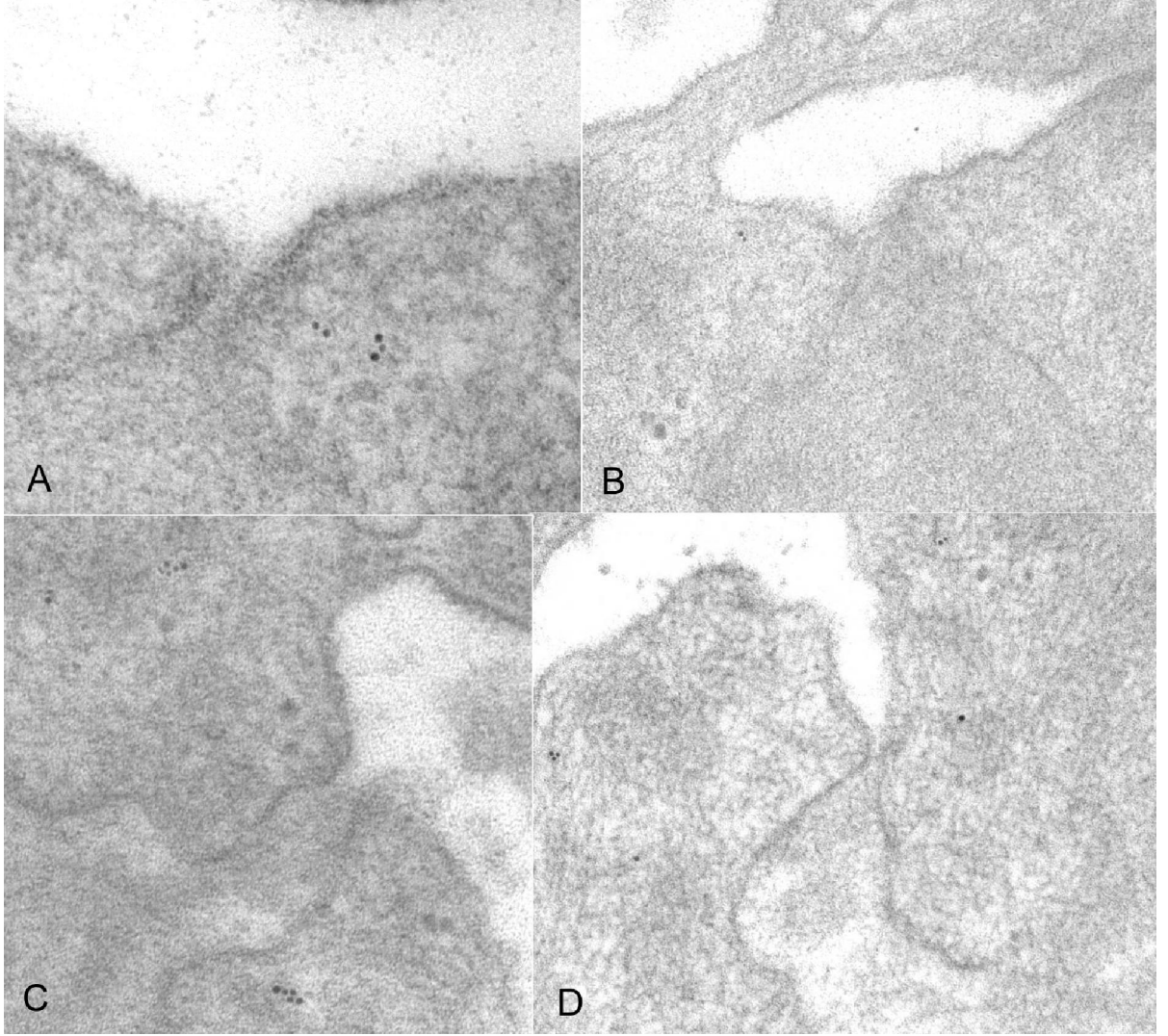
Resim 18: Kontrol Grubu CD2AP Ekspresyonu (A: X150.000, B: X150.000, C: X150.000, D: X150.000).

Minimal Değişiklik Hastalığı (MDH) Grubu: Genel olarak CD2AP işaretlenmesi kontrole göre azalmıştı. Geniş düzleşme alanlarında filtrasyon yarıklarının kapandığı bu alanlarda işaretlenmenin de azaldığı belirlendi. Bu kapanmış filtrasyon yarığı alanlarında ayaksı uzantılar içinde bir miktar CD2AP işaretlenmesi görüldü. CD2AP ekspresyonunun açık filtrasyon yarıklarında da azaldığı görüldü. Bazı desmozomal sıkı bağlantı bölgelerinde işaretlenme izlendi. Bazı filtrasyon yarıkları kapanmış veya daralmış olsa da, SD apikale yer değiştirmiş görünse de, CD2AP işaretlenmesinin bulunduğu dikkati çekti (Resim 19A,B,C,D).



Resim 19: MDH Grubu CD2AP Ekspresyonu (A: X120.000, B: X120.000, C: X150.000, D: X150.000).

Membranöz Glomerülonefrit (MN) Grubu: Çok sayıda daralmış, kapanmış filtrasyon yarığı görüldü, yapıları bozuktu, bu alanlarda az miktarda işaretlenme görüldü. Açık filtrasyon yarığı alanlarında ayaklı uzantılarda daha fazla işaretlenme saptandı fakat işaretlenme genel olarak azalmıştı. Membranöz glomerülonefrit grubunda işaretlenme olmayan alan daha fazla görüldü. Bu grupta CD2AP işaretlenmesi, kontrol ve MDH grubundan daha az olarak izlendi (Resim 20A,B,C,D).

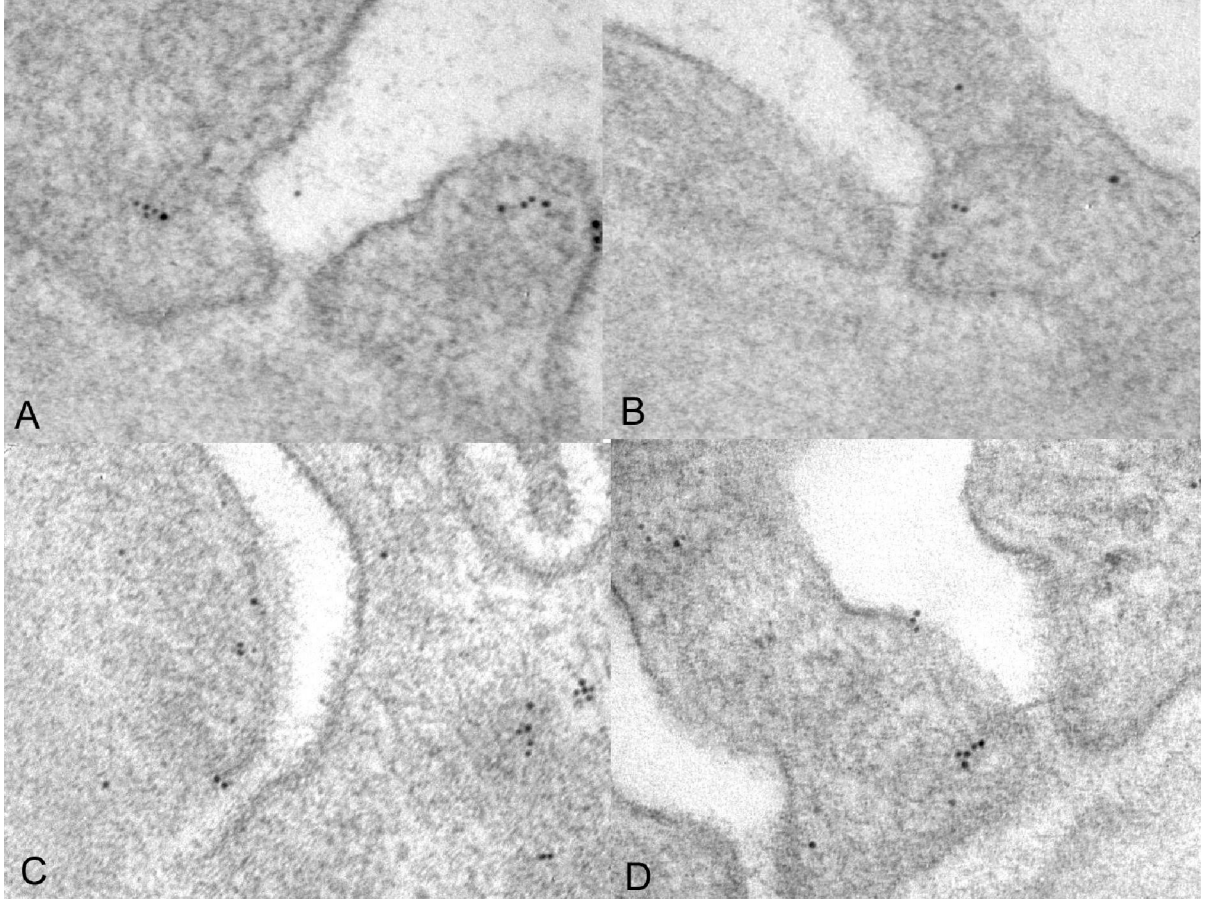


Resim 20: Membranöz GN Grubu CD2AP Ekspresyonu (A: X150.000, B: X100.000, C: X120.000, D: X120.000).

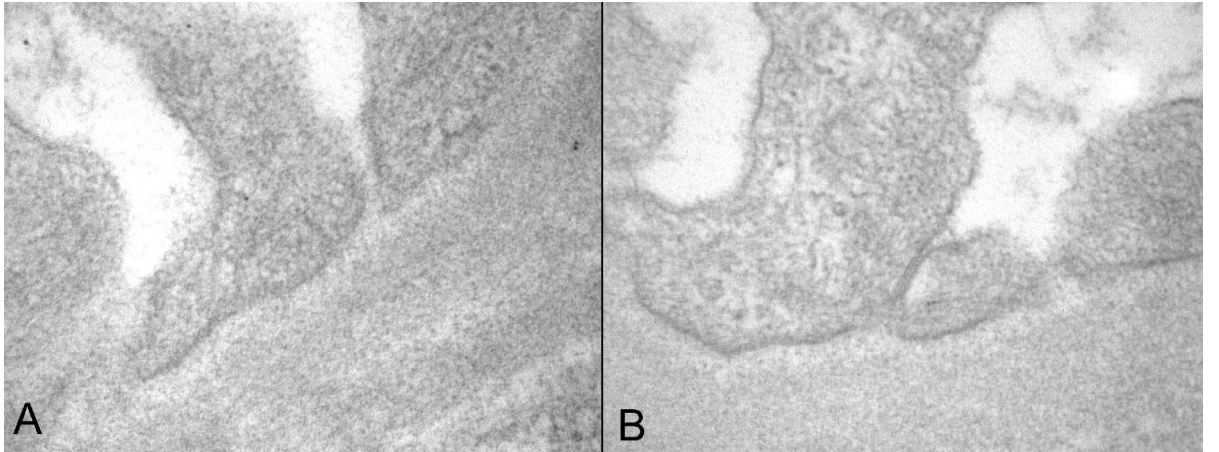
Membranoproliferatif Glomerülonefrit (MPGN) Grubu: Daralmış, kapanmış ve yapısı bozuk filtrasyon yarıklarının olduğu alanlardaki ayaksı uzantılarda CD2AP işaretlenmesi bir miktar azalmış olarak görüldü. Açık ve SD görülen filtrasyon yarıklarında, ayaksı uzantılarda daha fazla CD2AP işaretlenmesi belirlendi. Sıkı bağlantı oluşmuş olan birkaç alanda da işaretlenme görüldü. Genel olarak MPGN grubunda CD2AP ekspresyonunun, MDH ve MN hastalık gruplarına göre oldukça iyi işaretlenmiş olduğu saptandı. Kontrole en yakın CD2AP işaretlenmesi bu grupta görüldü (Resim 21A,B,C,D).

Fokal Segmental Glomerüloskleroz (FSGS) Grubu: Genel olarak işaretlenmenin çok az olduğu izlendi. Filtrasyon yarığı açık olsa da işaretlenmeyen alanlar daha fazlaydı. Kapanmış ve daralmış filtrasyon yarığı

alanlarında işaretlenme çok daha azdı, açık alanlarda nadiren ekspresyon görüldü. Bütün hastalık grupları içinde CD2AP ekspresyonunun en az olduğu grup FSGS grubu idi (Resim 22A,B).



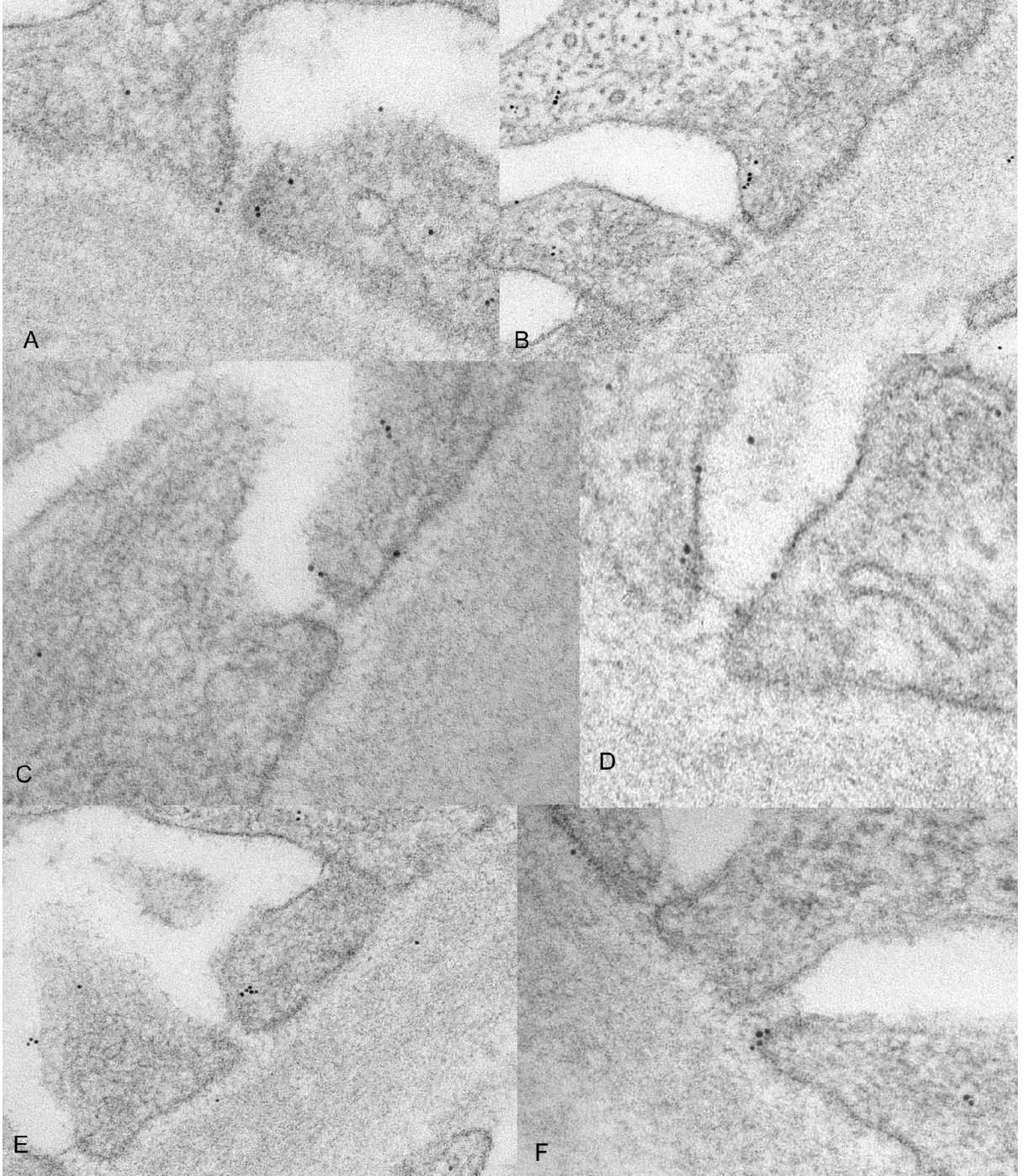
Resim 21: MPGN Grubu CD2AP Ekspresyonu (A: X120.000, B: X100.000, C: X120.000, D: X120.000).



Resim 22: FSGS Grubu CD2AP Ekspresyonu (A: X120.000, B: X120.000).

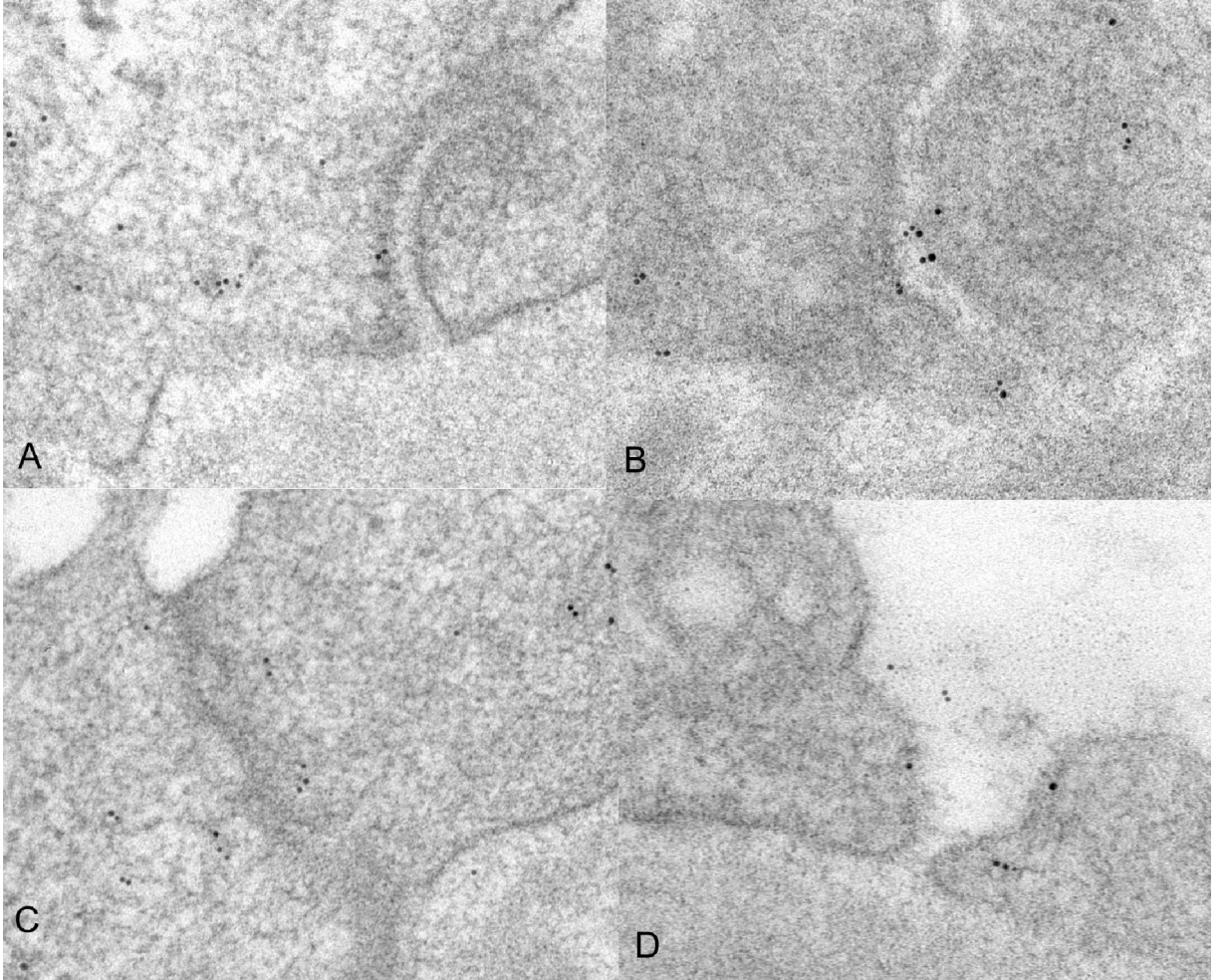
P-kaderin IEM Ekspresyon Bulguları

Kontrol Grubu: Açık filtrasyon yarıklarında SD'a yakın bölgede ayaklı uzantılarda p-kaderin işaretlenmesi görüldü. P-kaderin ekspresyonu, nefrine göre belirgin şekilde azdı (Resim 23A,B,C,D,E,F).



Resim 23: Kontrol Grubu P-Kaderin Ekspresyonu (A: X150.000, B: X150.000, C: X200.000, D: X150.000, E: X150.000, F: X200.000).

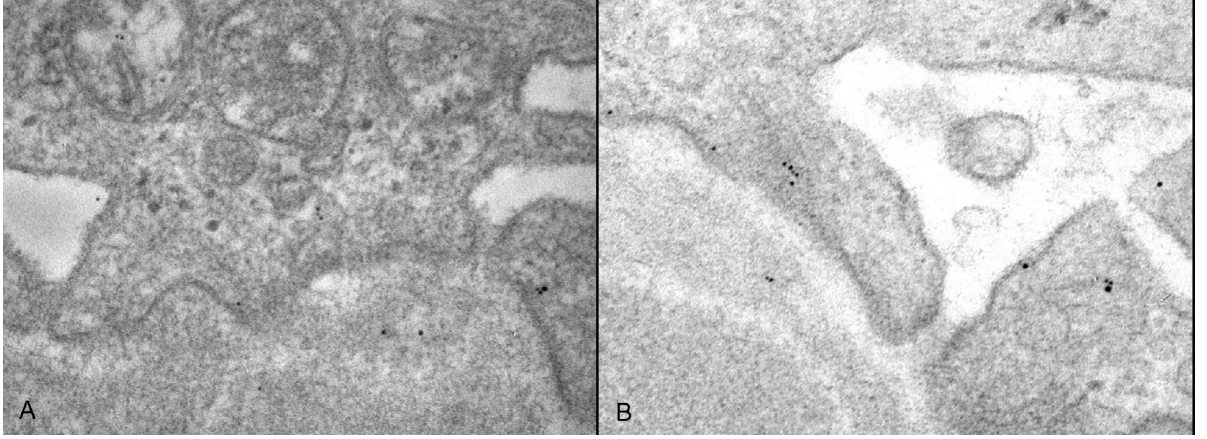
Minimal Değişiklik Hastalığı (MDH) Grubu: Sağlam ve açık kalan filtrasyon yarıklarına yakın ayaksı uzantılar içinde p-kaderin işaretlenmesi görüldü. Çok sayıda desmozomal sıkı bağlantı oluşumu belirlendi ve bunların bazılarının yakınlarında p-kaderin işaretlenmesi izlendi. MDH tanısı alanlarda, kapanmış filtrasyon yarıklarına yakın ayaksı uzantılarda diğer hasta gruplarına göre daha çok işaretlenme görüldü. Genel olarak p-kaderin işaretlenmesi azalmış olarak değerlendirildi (Resim 24A,B,C,D).



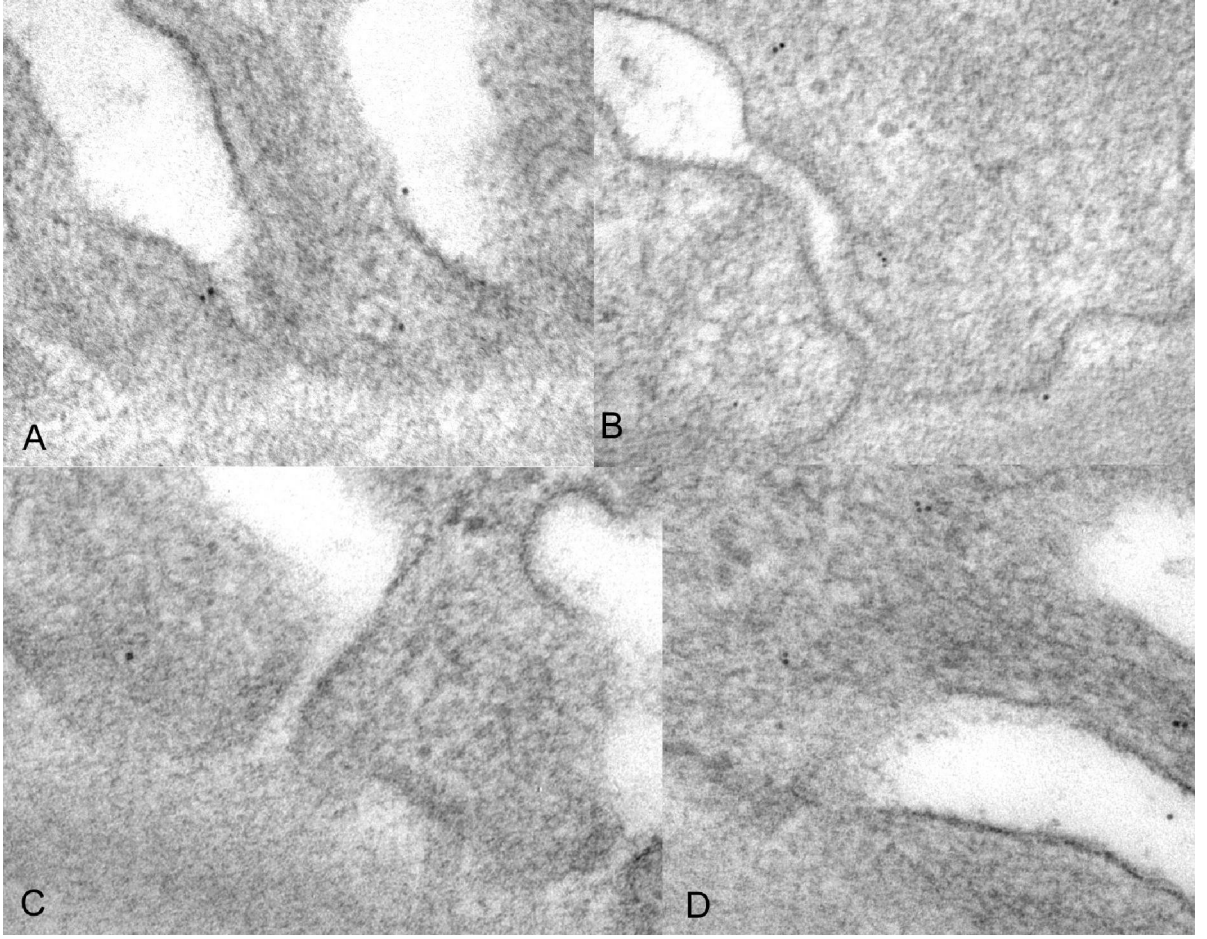
Resim 24: MDH Grubu P-Kaderin Ekspresyonu (A: X120.000, B: X150.000, C: X120.000, D: X150.000).

Membranöz Glomerülonefrit (MN) Grubu: Açık kalmış olan filtrasyon yarıklarına yakın ayaksı uzantılarda yer yer p-kaderin işaretlenmesi görüldü. Kapanmış ve daralmış olanlarda ekspresyon daha azdı. Genelde p-kaderin işaretlenmesi çok azalmış olarak değerlendirildi (Resim 25A,B).

Membranoproliferatif Glomerülonefrit (MPGN) Grubu: Açık olan filtrasyon yarıklarında bile çok az işaretlenme görüldü. Kapanmış ve daralmış filtrasyon yarıklarındaki ekspresyon ise çok daha azdı. Genel olarak MPGN hasta grubunda p-kaderin işaretlenmesi azalmış olarak değerlendirildi (Resim 26A,B,C,D).

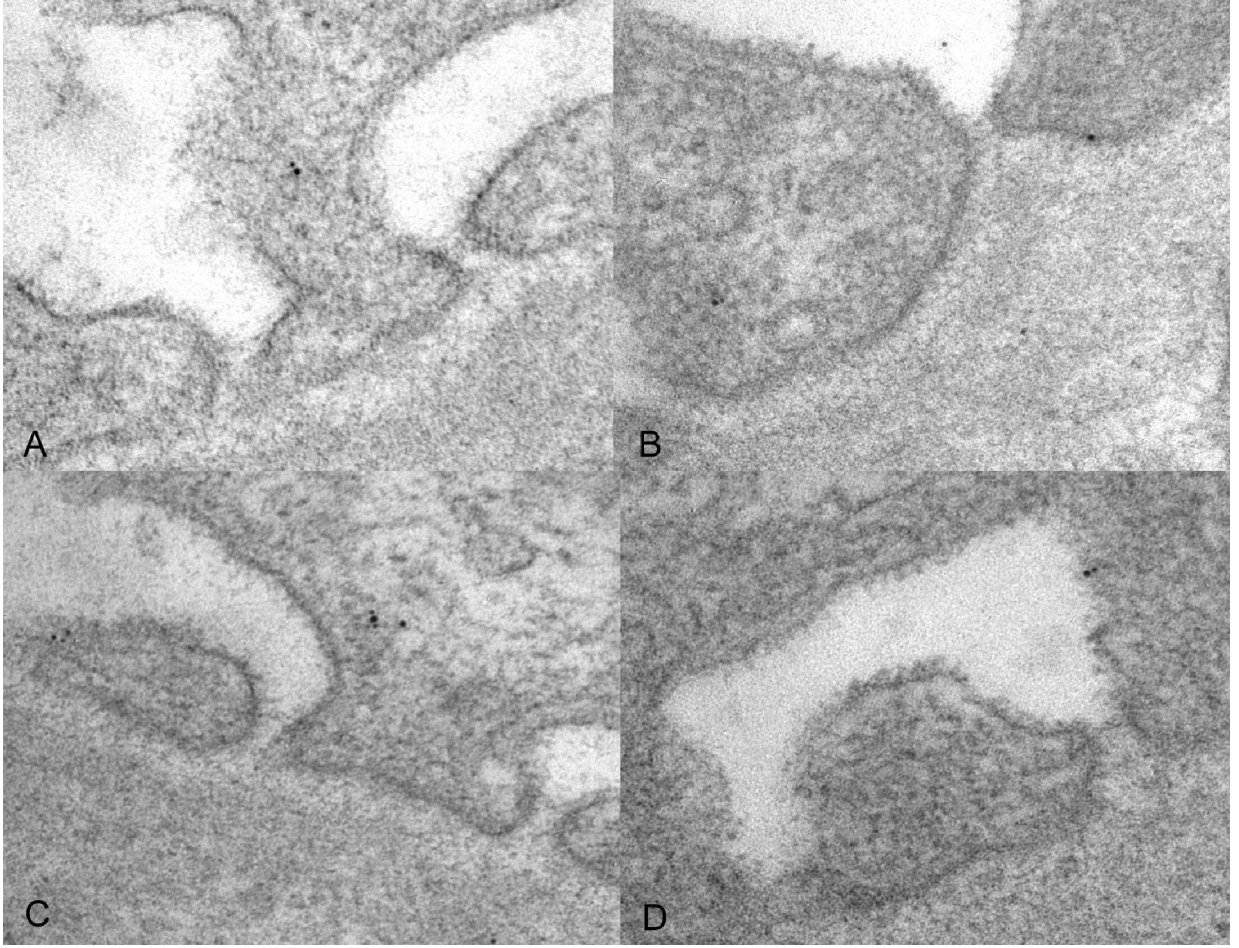


Resim 25: Membranöz GN Grubu P-Kaderin Ekspresyonu (A: X100.000, B: X100.000).



Resim 26: MPGN Grubu P-Kaderin Ekspresyonu(A: X120.000, B: X120.000, C: X120.000, D: X120.000).

Fokal Segmental Glomerüloskleroz (FSGS) Grubu: Genel olarak işaretlenme çok belirgin değildi, ama filtrasyon yarıklarında SD'lara yakın ayaksı uzantılarda işaretlenme görüldü, biraz apikale yer değiştiren işaretlenmeler de görüldü. P-kaderin işaretlenmesi MPGN hasta grubuna benzer veya biraz daha artmış olarak değerlendirildi (Resim 27A,B,C,D).



Resim 27: FSGS Grubu P-Kaderin Ekspresyonu (A: X120.000, B: X120.000, C: X120.000, D: X120.000)

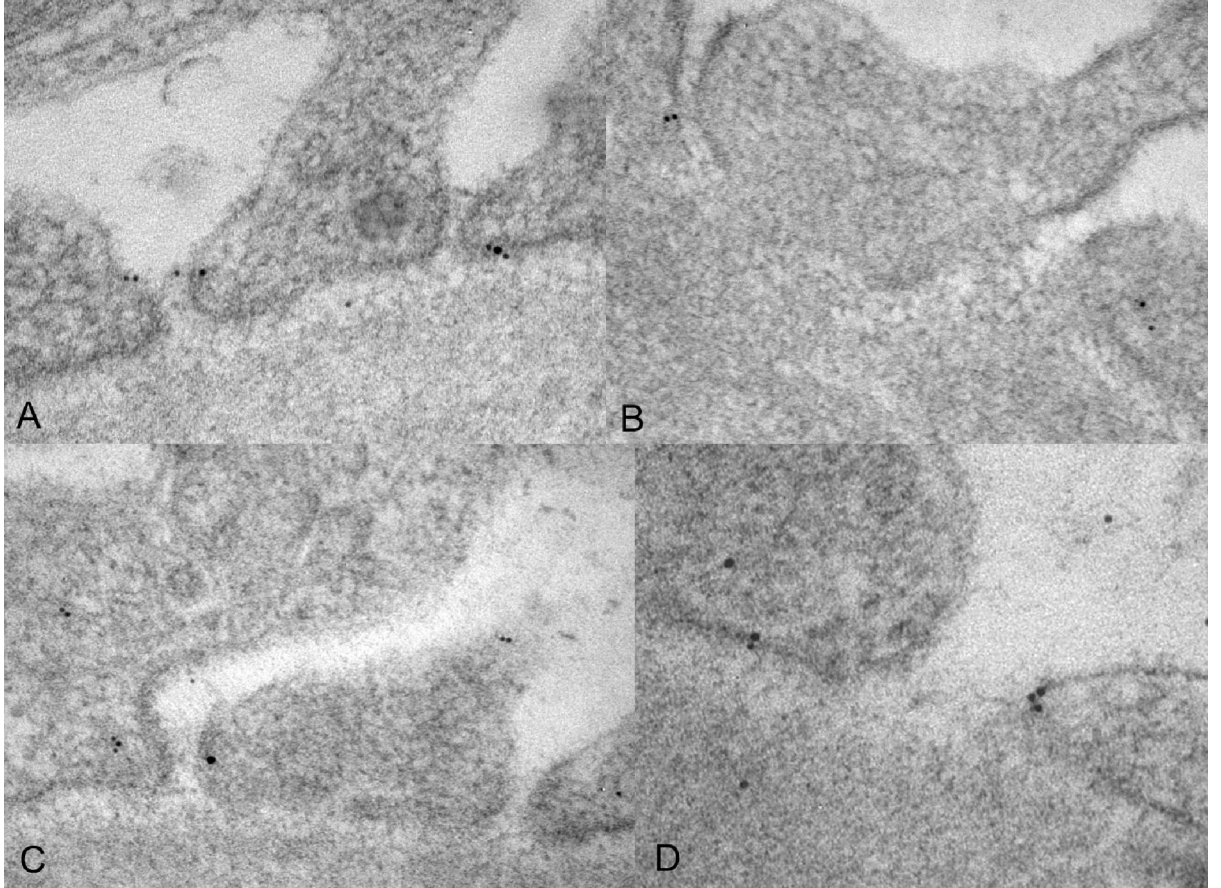
Podosin (NPHS2) IEM Ekspresyon Bulguları

Kontrol Grubu: Filtrasyon yarıklarında SD'lara yakın bölgede ayaklı uzantılarda podosin işaretlenmesi görüldü. P-kaderine göre daha iyi işaretlenme gözlemlendi (Resim 28A,B,C,D).

Minimal Değişiklik Hastalığı (MDH) Grubu: Açık olan filtrasyon yarıklarına yakın ayaklı uzantılarda podosin işaretlenmesi görüldü. Daralmış olan ve hatta kapanmış filtrasyon yarıklarında bile işaretlenme görüldü. MDH grubunda podosin ekspresyonu nefrin kadar, belki nefrinden de daha iyi olarak değerlendirildi. Bu gruptaki hastalarda filtrasyon yarıklarının çoğunun kapandığı görüldü ve bu alanlarda çok sayıda desmozomal sıkı bağlantılar olduğu görüldü, bu yapıların hemen yakınında podosin ekspresyonu olduğu izlendi.

Sadece podosin için değil, çalışılan diğer antikordlarda da, minimal değişiklik hastalarında bu yapılara yakın yerlerde işaretlenme olduğu görüldü (Resim 29A,B,C,D,E,F).

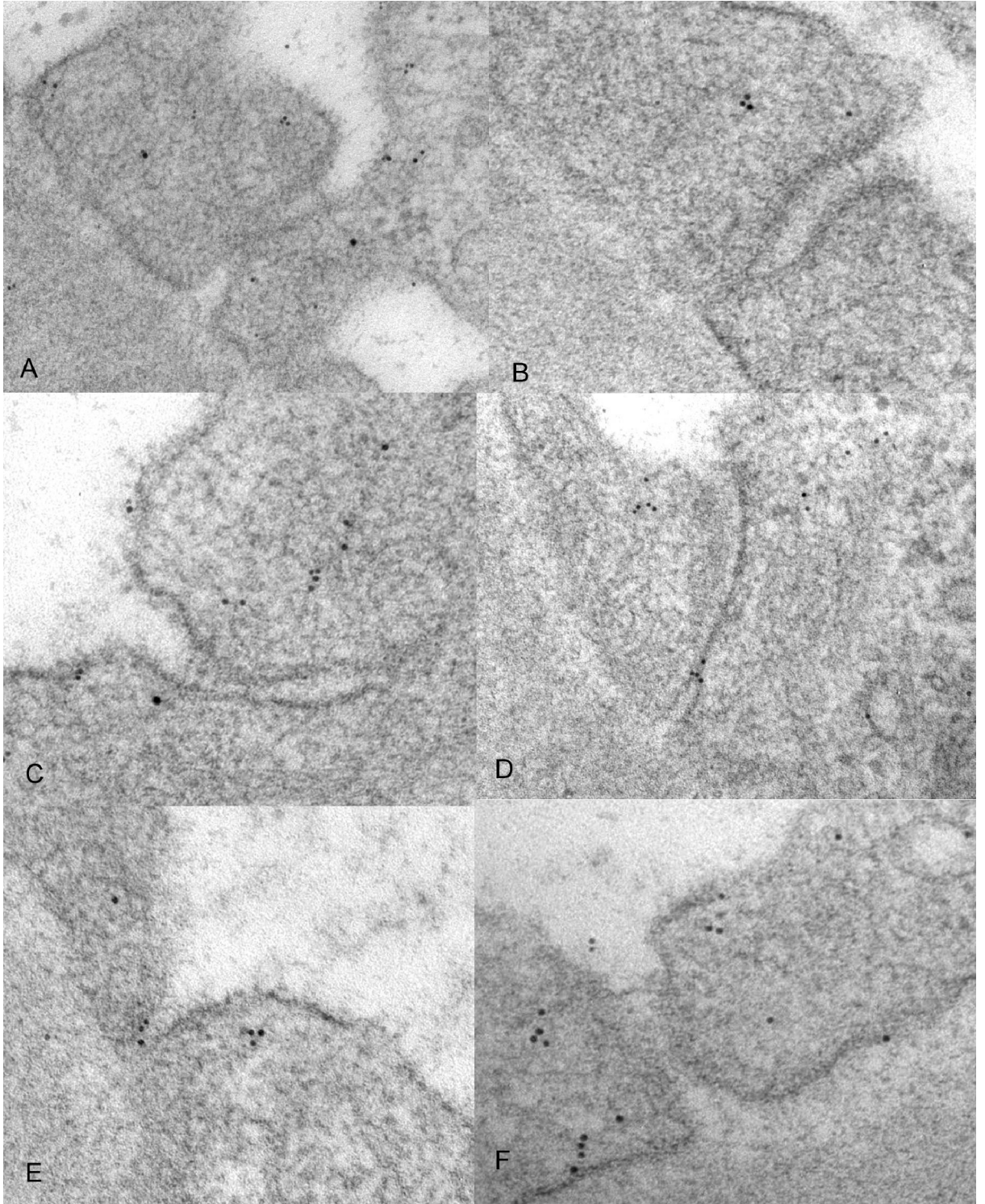
Membranöz Glomerülonefrit (MN) Grubu: Filtrasyon yarığı yapısının bozuk olduğu alanlarda podosin işaretlenmesi azdı, filtrasyon yarıklarının açık, yapılarının düzgün olduğu alanlarda ayaksı uzantılarda bir miktar işaretlenme vardı, ama genel olarak podosin işaretlenmesi azalmış olarak değerlendirildi (Resim 30A,B).



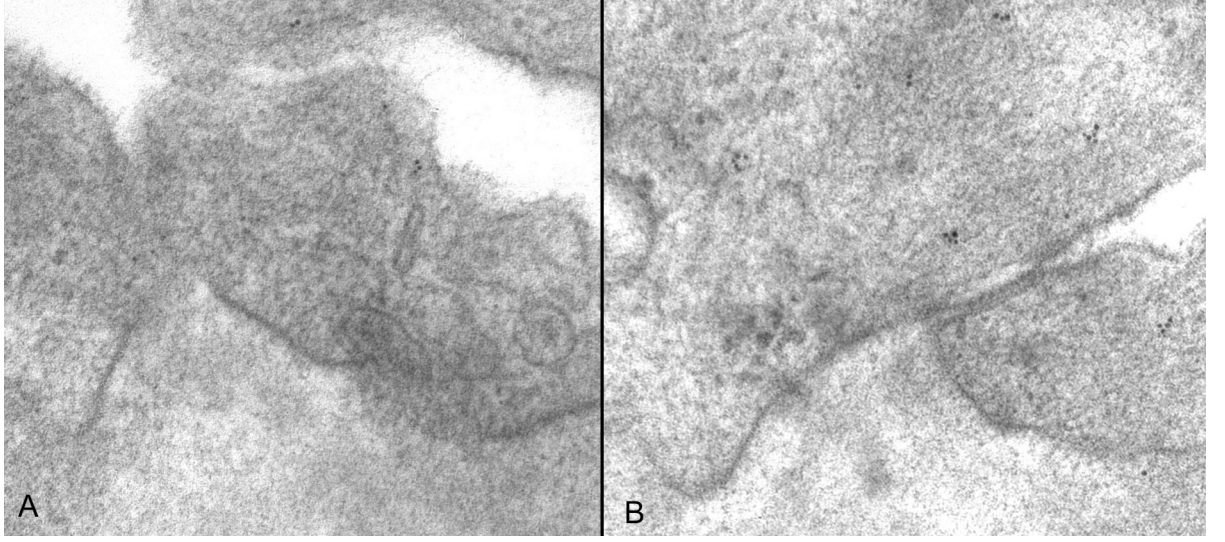
Resim 28: Kontrol Grubu Podosin Ekspresyonu (A: X120.000, B: X120.000, C: X120.000, D: X120.000).

Membranoproliferatif Glomerülonefrit (MPGN) Grubu: Açık ve yapısı sağlam görünen filtrasyon yarıklarına yakın ayaksı uzantılarda podosin işaretlenmesi görüldü. Yapısı bozuk olanlarda işaretlenme daha az olmuştu, yapı sağlam gözükmesine rağmen işaretlenme olmayan bölgeler de vardı. Desmozom benzeri yapılar görüldü, bunlardan işaretlenme olanlara rastlandı. Podosin işaretlenmesi membranöz glomerülonefrit grubundaki hastalardan daha iyi

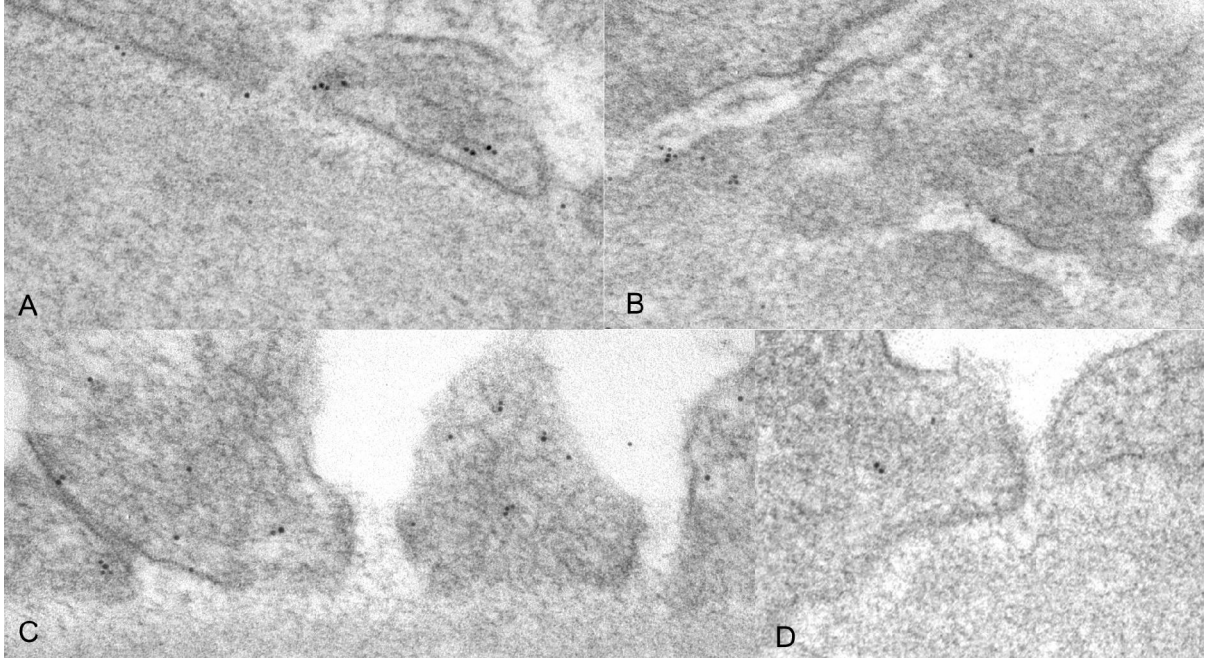
olarak değerlendirildi, ancak bu grupta CD2AP kadar işaretlenme yoktu, daha az işaretlenme goroldu (Resim 31A,B,C,D).



Resim 29: MDH Grubu Podosin Ekspresyonu (A: X100.000, B: X120.000, C: X120.000, D: X100.000, E: X120.000, F: X120.000).



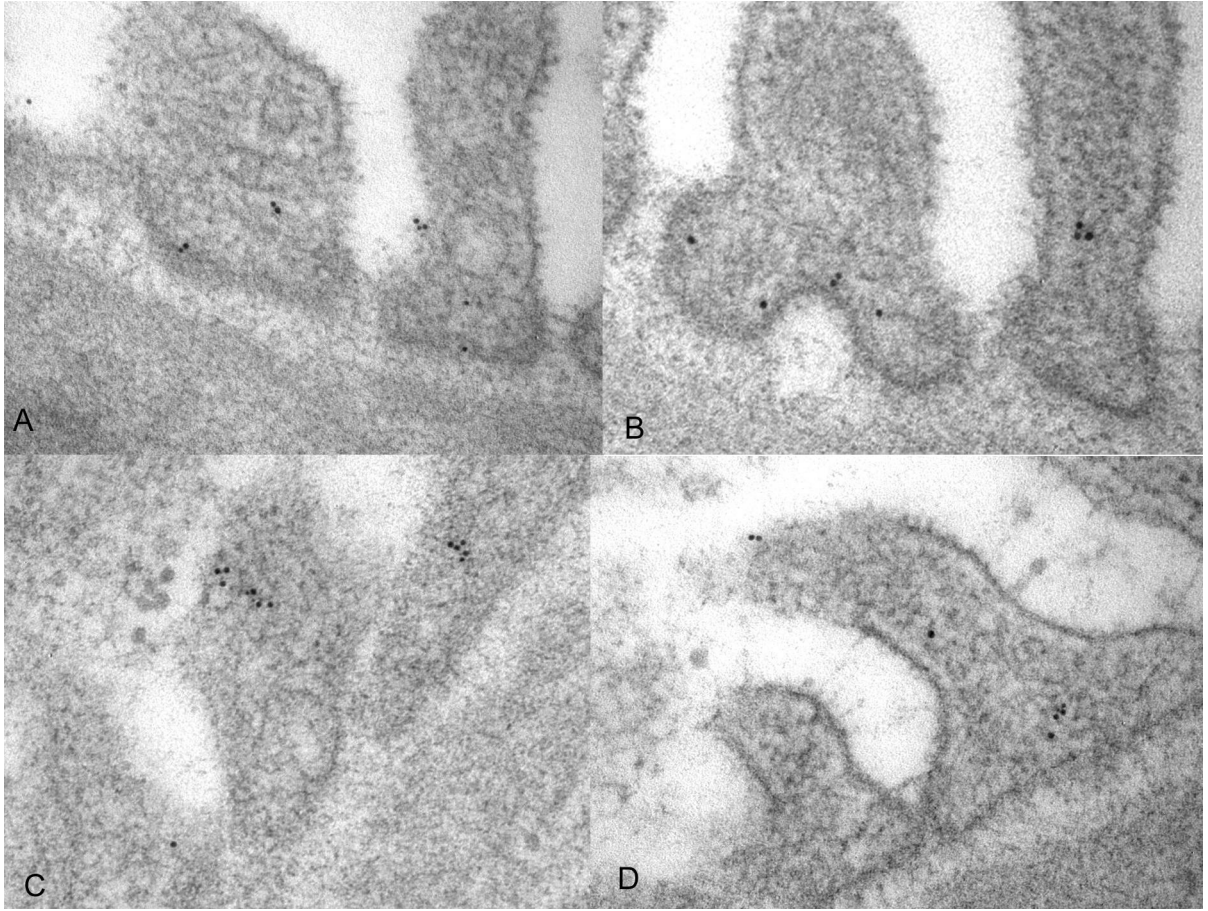
Resim 30: Membranöz GN Grubu Pododin Ekspresyonu (A: X100.000, B: X100.000).



Resim 31: MPGN Grubu Pododin Ekspresyonu (A: X120.000, B: X100.000, C: X120.000, D: X100.000).

Fokal Segmental Glomerüloskleroz (FSGS) Grubu: Açık, yapısı sağlam filtrasyon yarıklarına yakın ayaklı uzantılarda işaretlenme vardı, açık olup da, işaretlenmeyen bölgeler de görüldü. Filtrasyon yarıklarının bazılarında apikal ve bazal bölgelerde de işaretlenme izlendi. Genel olarak işaretlenmenin azaldığı belirlendi. FSGS hasta grubunda pododin işaretlenmesi MPGN hasta grubundan daha fazla olarak değerlendirildi (Resim 32A,B,C,D).Hastalık

gruplarına göre İEM protein ekspresyon değişiklikleri Tablo 4'te topluca verilmiştir.



Resim 32: FSGS Grubu Podosin Ekspresyonu (A: X120.000, B: X120.000, C: X120.000, D: X150.000)

Tablo 4: Hastalık gruplarına göre İEM protein ekspresyon değişiklikleri

Protein	MDH Grubu	MN Grubu	MPGN Grubu	FSGS Grubu	Kontrol Grubu
Nefrin	Azalmış ++++	Azalmış +	Azalmış +++	Azalmış ++	+++++
Aktin	Artmış +++	Artmış ++++	Artmış +++++	Artmış ++	+
CD2AP	Azalmış +++	Azalmış ++	İyi +++++	Azalmış +	+++++
P-Kaderin	Azalmış ++++	Azalmış +	Azalmış ++	Azalmış +++	+++++
Podosin	İyi +++++	Azalmış +	Azalmış ++	Azalmış +++	+++++

TARTIŞMA

Proteinüri ile seyreden böbrek hastalıklarında sık görülen morfolojik değişiklik, ayaksı uzantılarda silinmedir. Silinme direkt hasara veya glomerüldeki değişikliklere yanıt olarak oluşabilir, her iki durumda da epitelde oluşan anormal bir cevap olarak kabul edilmektedir. Bu silinme süreci podosit ayaksı uzantılarında yer alan aktin iskeletteki değişikliklerle birliktedir, ancak moleküler temeli henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.^{133,158}

A.T. Lahdenkarı ve arkadaşlarının MDH ve Fin tipi konjenital nefrotik sendromlu 18 hastayla yaptığı çalışmada, transmisyon elektron mikroskopik incelemede elde edilen morfolojik bulgularda; kontrollerin aksine proteinürik hastalarda ayaksı uzantılarda silinme çok belirgin olarak görülmüştür.¹²⁷ Ayaksı uzantılarda organizasyon kaybı (silinme veya füzyon gibi) nefrotik insan ve hayvan çalışmalarında daha önce de bildirilmiştir.^{159,160,161} Ağır proteinürik Fin tipi nefrotik sendromlu hastalarda MDH'lı hastalardan daha fazla lezyon bulunduğu görülmüştür.¹²⁷ Podosit por sıklığının (her 1 mm GBM uzunluğu boyunca izlenen slit diafram sayısı) kontrollere göre azaldığı gösterilmiştir.¹²⁷ İncelenen tüm örneklerde podositlerin GBM'ı örttüğü görülmüş, masif proteinürili hastalarda bile GBM'den ayrılma görülmemiştir. Sadece 2 MDH'lı hastada GBM üzerinde çok küçük soyulmuş (erozyone) bir alan görülmüştür.¹²⁷ Daha önce özellikle aminonükleozid nefropatili sıçanlarda bildirilen podositin GBM'dan ayrılması ve GBM'da erozyone alan bulguları Lahdenkarı ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada görülmemiştir.^{160,130,162}

Yoshikawa ve arkadaşları nefrozlu ve MDH'lı 33 hastanın 16'sında küçük odaklarda epitel ayrılması bulmuşlardır. Epitel ayrılması bulgusunun insanlarla yapılan çalışmalarda sıçanlarla yapılanlardan daha az belirgin olduğu belirtilmiştir.¹⁶³

Lahdenkarı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada proteinürik ve nonproteinürik böbreklerde podositlerde endositik aktivitede farklılık bulunmamıştır.¹²⁷ Bu endositik invaginasyonlar örneklerin tümünde apikal ve bazal yüzeyde, podositlerin normal yapı gösterdiği ve silinmeyle birlikte olan alanlarda görülmüştür.¹²⁷ Çalışmada ortalama slit por genişliği 27-28 nm olarak ölçülmüştür. Çok az sayıda slit por genişliği 50-80 nm kadar geniş bulunurken,

daha sıklıkla slit porların daraldığı görülmüştür.¹²⁷ Bazı ağır proteinürik Fin tipi konjenital nefrotik sendromlu hastalarda slit porların yarıya yakını daralmış olarak bulunmuştur.¹²⁷ Bazı kısımlarda komşu ayaklı uzantılar arasında görülebilir boşluk izlenmemiştir.¹²⁷ Kontrol böbreklerde de %20 daralma olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.¹²⁷

GBM'dan epitel hücrelerin ayrılmasının mekanizmasının; epitel hücrelerini GBM'a sabitleyen yapılarda (integrinler ve distroglikanlar) bozulma sonucunda veya ayaklı uzantılarda retraksiyon sonucunda olabileceği öne sürülmüştür.¹²⁷

Podosit ayaklı uzantılarındaki kenetlenme kompleksinin kaybıyla meydana gelen düzleşmenin nefrotik böbrekte protein kaçağını açıklamaya yetmeyeceği belirtilmiştir.¹²⁷ Düzleşme sonucu oluşan sitoplazma genişlemesinin sıklıkla kapiller duvarda GBM'ı sıkıca örttüğü, yalnızca arada sırada kesintiye uğradığı bildirilmiştir.¹²⁷

Glomerüler hastalıklardaki proteinürinin oluşma mekanizmasına da iki farklı açıklama getirilmiştir.¹²⁷ Bunlardan birine göre proteinüri; podositlerin GBM'dan ayrılmasıyla oluşan fokal boşluklardan (gap) artan sıvı akışının üriner boşluğa doğru plazma proteinlerini sürüklemesiyle oluşur.¹²⁷ Hayvan modeli çalışmalarında proteinürinin başlangıcıyla GBM'da erozyone (soyulmuş) bölgelerin gelişiminin çakıştığı gösterilmiştir.^{160,128} Bu gibi alanlar insan nefrotik böbrekleriyle yapılan iki çalışmada da bildirilmiştir.^{163,164}

Proteinüri oluşma mekanizması için ikinci açıklamada ise; nefrotik böbreklerde çok miktarda proteinin podositlerden aktif endositoz aracılığıyla ultrafiltrat içine geçebileceği hipotezidir.¹²⁷ Bu durum, sıçanlarda akut aminonükleozid nefrozunda ve proteinürik insan böbreklerinde epitel hücrelerinde lizozomlar, fagozomlar ve pinositotik vezikül miktarlarının arttığını ortaya koyan elektron mikroskopik çalışmalarla desteklenmiştir.^{129,165} Pinositotik invaginasyonlar da aminonükleozid nefrozlu sıçanlarda birçok çalışmada tanımlanmıştır.^{50,129,130,49} Podositlerdeki vakuollerin; hücrenin bir yüzünde idrar boşluğuyla, diğer yüzünde ise GBM'ın üstünde kalan hücre dışı boşlukla iletişim kurduğu düşünülmüştür.¹³¹

A.T. Lahdenkari ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Fin tipi konjenital nefrotik sendrom ve MDH'li hastalarda, hücre membranının apikal ve bazal yüzeyinde pinositotik invaginasyonların sayımı yapılmıştır, ancak proteinürik ve nonproteinürik glomerüller arasında invaginasyonlarda farklılık olmadığı sonucuna varmışlardır.¹²⁷ Bu durum çalışmacılarda bu iki hastalıkta endositozun kapiller duvar boyunca protein kaybında önemli rol oynamadığı fikrini oluşturmuştur.¹²⁷ Çalışmanın sonucunda da proteinüriye slit diafram yapısındaki moleküler değişikliklerin neden olduğunu, ayaksız uzantılar kompleksindeki kenetlenme kaybının sekonder bir lezyon olduğunu, proteinüri gelişimi için kritik olmadığı sonucuna varmışlardır.¹²⁷

Bizim yaptığımız çalışmada filtrasyon yarıklarının oldukça daralmış olduğu, bazı hastalarda filtrasyon yarıklarının kenarlarında filamentöz materyal bulunduğu gördük. Filamentöz materyali hastalık gruplarına göre çok ya da az olarak değerlendirmedik ancak filtrasyon yarıklarında daralmanın fazla olduğu hastalarda daha fazla izledik.

Bizim çalışmamızda pedisel düzleşmesinin olduğu alanlarda izlenen aktin yoğunlaşması MDH ve MPGN hasta gruplarında bant tarzındaydı. Membranöz Nefropati(MN) hasta grubunda birikim olan alanların üzerindeki ayaksız çıkıntılarda toplanmıştı, diğer yerlerde yoktu. MN hasta grubunda birikim ve üzerinde aktin yoğunlaşması evre II hastalarda en fazlaydı, evre III ve IV te ise birikimin rezorbe olduğu, aktin yoğunlaşmasının azaldığı görüldü.

MPGN hasta grubunda hastalık patolojisinin daha çok mezangiyal alanı etkilediği, bu nedenle bu bölgenin yapısının oldukça bozuk olduğu, filtrasyon yarıkları ve podosit yapısının ise genel olarak daha düzgün olduğu düşünüldü.

FSGS hasta grubunda glomerülün dejenere bölümünün yapısının kötü olduğu, yapıların iyi seçilemediği görüldü, glomerülün daha iyi olan bölümünde filtrasyon yarıklarının ve podosit yapısının MPGN hasta grubu kadar olmasa da iyi görüldüğü gözlemlendi. FSGS hasta grubunda glomerülün dejenere olmayan bölümünde podosit ve filtrasyon yapıları morfolojik olarak iyi görünse de hastaların klinik bulguları diğer hasta gruplarına göre daha kötüydü ve grubun tedaviye yanıtı bir hastadaki kısmi remisyon dışında iyi değildi.

MDH hasta grubunda proteinüri varolmasına rağmen immunfloresan mikroskopik immunglobulin ve C3 birikimi hastaların hiçbirinde tesbit edilmemişti ve hastaların hepsinde tam remisyon sağlanmıştı.

Membranöz hasta grubunda laboratuvar bulguları MDH hasta grubuna benziyordu ancak immunfloresan mikroskopik birikim olan hastalar vardı, tedaviye yanıt yine iyi görünüyordu.

MPGN hasta grubu; laboratuvar bulgularında proteinüri ortalaması en düşük olan gruptu, ancak immun kompleks birikimleri vardı, bir hasta tedaviye yanıt vermedi.

MDH hasta grubunda pedisel düzleşmesine sebep olan patolojinin hızlı geliştiği, pedisel düzleşmesinin yaygın olmasına rağmen mezangiyal alan, bazal membran ve endotel hücrelerinin pek etkilenmediği düşünülürdü. Hızlı gelişen patolojiye yanıt olarak slit diafram yapılarının hızla kaybolduğu, filtrasyon yarıklarının da hızla kapandığı ve yine desmozomal sıkı bağlantı oluşarak bu bölgenin glomerülogenez aşamasının erken dönemlerindeki haline dönüştüğünü düşündürdü.

Proteinüri ile seyreden glomerüler hastalıklarda proteinürinin sebebine gelince; biz de çalışmamızda MDH hasta grubu da dahil olmak üzere hemen tüm gruplarda GBM'da küçük erozyone alanlar, GBM ile epitel arasında açılma olan alanlar ve az sayıda podosit kaybı olan alanlar gördük. Ayrıca yine tüm gruplarda endositotik veziküller ve çok sayıda bazal invaginasyonları tesbit ettik. Ancak bunların proteinürinin primer nedeni değil proteinüriye sekonder gelişmiş lezyonlar olabileceğini düşündük. Proteinüri sebebinin de, A T Lahdenkari ve arkadaşlarının¹²⁷ önerisiyle uyumlu olarak, slit diafram bölgesinin moleküler yapısının bozulmasından ve bu bölgede meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığını düşündük.

Slit diaframların glomerülogenezin erken aşamalarında sıkı bağlantılardan köken aldığı ve proteinüri ve ayaksız uzantı kaybı veya silinmesiyle birlikte olan bir çok hastalıkta restorasyon oluşarak sıkı bağlantıların bitişik ayaksız uzantılar arasında tekrar görüldüğü düşüncesi,^{49,50} bize göre de doğrudur, çünkü biz de özellikle MDH hasta grubunda olmak üzere kapanmış

filtrasyon yarıkları arasında çok sayıda desmozom benzeri sıkı bağlantı bölgesi gördük. İlginç yanı da bu yapıların slit diafram bölgesinde olduğunu doğrular şekilde çok yakınında çalıştığımız proteinlerin eksprese olduğunu tesbit ettik. Bize göre de slit diaframlar proteinüri ile seyreden nefrozlarda sıkı bağlantılara dönüşüyorlardı, pedisel düzleşmesine ve filtrasyon yarıklarının kapanmasına sebep olan patoloji ortadan kalktığında da tamir mekanizması ile eski haline dönüşebiliyordu.

Proteinüri ile seyreden glomerüler hastalıklarda böbrek dokusunun transmisyon elektron mikroskopik incelenmesinde aynı hasta gruplarında bile çok farklı bulgular olabileceğini gördük. Örneğin genellikle sadece pedisel silinmesi bulgusu vurgulanan minimal değişiklik hastalığında GBM'dan ayrılmaya, endositotik veziküllere, bazal invaginasyonlara, desmozom benzeri sıkı bağlantılara ve podosit içinde vakuollere kadar çok değişik bulgular görebildik. Bu diğer hasta grupları için de geçerliydi. Membranöz glomerülonefrit hasta grubunda subepitelyal birikimlerin ve hemen çevresinde oluşan aktin yoğunlaşmasının hastalığın tanısı ve evrelemesinde önemli olabileceğini düşündük.

Proteinürik glomerüler hastalıklarda morfolojik değişikliklerin elektron mikroskopik olarak değerlendirilmesinin klinik takip ve laboratuvar bulgularına göre birbirine çok benzeyen tablolarda ayırıcı tanıya gidilmesinde önemli olabileceğini düşündük.

Nefrin; slit diafram bölgesinde hücre içi ve hücre dışı bölümleri olduğu bilinen, aktin iskeletin korunması ve sürdürülmesinde ayaksız uzantılardaki hücre içi proteinlerle ilişki kuran ayrıca hücre dışı bölümü ile slit diafram bölgesi proteinlerle birlikte filtrasyonun korunması ve sürdürülmesinde etkili olan çok önemli bir moleküldür. Proteinüri ile seyreden birçok edinilmiş glomerüler hastalıkta nefrin ekspresyonu, hastalıkların patogenezinin aydınlatılması için araştırma konusu olmuştur. Proteinüri ile seyreden glomerüler hastalıklarda nefrin ekspresyonunun değiştiği birçok araştırmada gösterilmiştir. Fin tipi konjenital nefrotik sendrom gibi patolojilerde nefrin ekspresyonu tamamen ortadan kalkmaktadır.¹⁶⁶

Furness 1999'da minimal değişiklik hastalığı ve membranöz nefropatili dört olguda PCR yöntemi ile mRNA miktarlarını değerlendirmiş ve kontrol grubuna göre azalma olduğunu tesbit etmiştir.¹⁶⁷

Patrakka 2001'de FSGS, Henoch-Shönlein nefriti, IgA nefriti, MDH, membranöz nefropati ve membranoproliferatif glomerülonefritli 56 olguluk bir çalışma yapmış, immunhistokimya ve vakaların bir kısmına insitu hibridizasyon uygulamıştır. Bu şekilde nefrin ekspresyonunu değerlendirmiştir. Nefrin ekspresyonunun kontrol grubuna göre farklı olmadığını göstermiştir.¹⁶⁸

Srivastava ve arkadaşları FSGS, MDH ve konjenital nefrotik sendrom olgularında immunohistokimyasal olarak nefrin ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Nefrinin konjenital nefrotik sendromda tamamen kaybolduğunu, FSGS ve MDH'da ise nefrin ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir. Podosit hasarının nefrin ekspresyonundaki azalmayla ilgili olduğunu belirtmişlerdir.¹⁶⁶ FSGS'de nefrin ekspresyonunda azalmanın MDH'dan daha fazla olmasını, FSGS'de podosit hasarının daha yaygın olmasıyla açıklamışlardır.¹⁶⁶

Tryggvason K. ve Huh W. IgA nefrit, MDH, membranöz GN ve lupus nefriti tanısı alan 8 hasta grubuyla yaptıkları immünelektron mikroskopik çalışmada nefrin ekspresyonunu değerlendirmişlerdir.¹⁶⁹ Kontrol grubunda podosit ayakları uzantılarında intrasitoplazmik alanda ve hücre membranına yakın alanlarda, ayrıca slit diafram bölgesinde nefrin işaretlenmesini göstermişlerdir.¹⁶⁹ Podosit ayakları uzantılarında düzleşme olan alanlarda işaretlenen altın partikül sayısının oldukça azaldığını, sağlam yapıda filtrasyon yarıklarının olduğu bölgede nefrin işaretlenmesinin kontrol grubuyla benzer olduğunu göstermişlerdir.¹⁶⁹ Podosit ayakları altındaki 1000 nm uzunluğundaki bölümde nefrin için işaretlenen altın partikül sayısının kontrole göre azalmış olduğunu göstermişlerdir. Nefrinin sadece konjenital nefrotik sendromda değil edinilmiş glomerüler hastalıklarda da etkili olduğunu bildirmişlerdir.¹⁶⁹

İmmunohistokimya, PCR gibi yöntemlerle nefrin ekspresyonu için farklı sonuçlar elde edilmesini, glomerülopatilerde pedisel düzleşmesinin homojen olarak gerçekleşmemesine ve ciddi silinme oluşuncaya kadar geçen sürede nefrindeki değişimin fark edilmemesiyle açıklamışlardır.¹⁶⁹

Gerçekten podosit ayaklı uzantılarında silinme ve filtrasyon yarıklarında kapanma homojen olarak gerçekleşmez, hastalık sürecinde ve hasarın şiddetiyle bağlantılı olarak ilerler, biz de incelediğimiz hasta gruplarında özellikle MPGN ve FSGS hasta gruplarında daha fazla olmak üzere intakt kalmış filtrasyon yarıkları ve slit diaframlar gördük. Bu nedenle immunohistokimya ve PCR gibi yöntemlerle nefrin ekspresyonu normal ya da normale yakın olarak değerlendirilebilir. İmmunelektron mikroskopik yöntemle ise çok daha kesin bir lokalizasyon bilgisi vereceği için nefrin işaretlemesinin daha spesifik olabileceğini düşündük.

13 olguluk MDH hasta grubuyla immunohistokimyasal ve semikantitatif immunelektron mikroskopik çalışmada nefrin ekspresyonu Wernerson ve arkadaşları tarafından değerlendirilmiştir. Ayaklı uzantılardaki silinmenin nefrin ekspresyonundaki azalmayla korele olduğunu belirlemişlerdir.¹⁷⁰ Ağır proteinürlü vakalarda immunfloresan yöntemi ile ışık mikroskopik düzeyde, nefrin işaretlenmesinin granüler boyanma paterni gösterdiğini, hafif proteinürisi olan ya da tedavi alan vakalarda mikst lineer ve granüler boyanma gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.¹⁷⁰

İmmunelektron mikroskopik olarak ayaklı uzantılarda silinmenin artmasıyla nefrinin granüler işaretlenmesinin arttığını belirtmişlerdir. Podosit ayaklı uzantılarında silinmenin yaygınlığı ile serum albumin konsantrasyonu arasında ters korelasyon varlığı göstermişlerdir.¹⁷⁰

Aynı araştırmacılar elektron mikroskop ile GBM'da bir mikrometrekarelik alandaki filtrasyon slitlerini saymışlar, incelenen ve olmayan ayaklı uzantılarda podosit mikrometresi başına düşen nefrin işaretlenmesini değerlendirmişlerdir.¹⁷⁰ Nefrin miktarının azaldığını göstermişlerdir. Total podosit alanına düşen nefrin ekspresyonunda azalma saptamışlar ve bu azalmanın sadece ayaklı uzantılardaki silinmeye bağlı olmadığını göstermişlerdir.¹⁷⁰

Wernerson sağlam olan ve varlığını koruyan filtrasyon yarıklarında nefrin ekspresyon miktarının değişmediğini, slit diaframın yapısal bütünlüğü için belli bir miktar nefrin konsantrasyonu gerektiğini savunmuştur.^{170,171} Ayaksı uzantılarda incelenen olduğu bölgelerdeki filtrasyon yarığı çevresinde hem nefrin azalmasına, hem de nefrinin sitoplazmada yeniden dağılımına dikkat çekilmiştir.^{170,171} Nefrinin yeniden dağılım döneminde hücre membranına katılabileceğini, ya da hücre içinde kalabileceğini veya idrar yolu ile atılabileceğini söylemişlerdir.¹⁷⁰ Sentezlenen nefrinle slit diaframların da yeniden yapıldığı, podosit ayaksı uzantılarında düzleşmeye neden olan etken ortadan kalkınca MDH'daki gibi podositler ve eklerinin eski halini alabileceği belirtilmiştir.¹⁷¹

Doublier ve arkadaşları nefrotik sendromda podositlerde oluşan nefrin yeniden dağılım mekanizmasının proteinüriye neden olduğunu iddia etmişlerdir.¹⁷² FSGS, MDH, MN ve kontrol grubundan oluşan 46 olguluk çalışmada indirek immunfloresan yöntem ile primer hastalığa bakılmaksızın, hastalık gruplarında yaygın nefrin ekspresyon kaybı olduğunu ve lineer boyanmanın granüler tarza dönüştüğünü bildirmişlerdir.¹⁷² Glomerüler hastalıklarda etkili olan faktörlerin hücre iskeletini değiştirerek nefrin yeniden dağılımına neden olabileceğini glomerüler epitel hücre kültüründe göstermişlerdir.¹⁷² Hücre iskeletindeki aktivasyon nefrin ekspresyonunu etkileyerek plazma membranından hücre dışı alana yer değiştirmesine neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir.¹⁷²

B.K Kim immunohistokimya ile MDH'da nefrin için ince granüler boyanma, FSGS'de kaba granüler boyanma göstermiştir.¹⁷³

B.K Kim MDH'da immunelektron mikroskopik olarak düzleşmiş ayaksı uzantılarda nefrin işaretlenmesi görülmediğini, nefrinin podositlerde dağınık halde bulunduğunu, intakt olan slit diaframlarda ise işaretlenen nefrin partikül sayısının kontrol grubu ile farklılık göstermediğini ileri sürmüştür.¹⁷³

FSGS hastalarında ise düzleşmiş ayaksı uzantılarda, podositlerde ve intakt kalan ayaksı uzantılarda işaretlenen partikül sayısında kontrol grubuna göre belirgin azalma olduğunu ileri sürmüştür.¹⁷³ Bu bulgulara göre de proteinüri ile seyreden glomerüler hastalıklarda nefrin ekspresyonunda değişiklikler

olduğu, MDH'da nefrin yeniden dağılımlının, FSGS'de ise nefrinde belirgin azalmanın etkili olduğunu belirtmiştir.¹⁷³ Ayaksı uzantılarda silinme sürecinde slit diaframdaki proteinlerin apikale yer değiştirmesi veya kaybı sonucunda granüler tarzda boyanmanın olduğunu ileri sürmüştür.¹⁷³ FSGS olgularında görülen düzensiz boyanmanın nefrinin yer değiştirmesine sekonder olabileceği, ayaksı uzantılarda retraksiyon ve mikrovillus oluşumu ile nefrinin filtrasyon yarıklarından mikrovillusa doğru yer değiştirdiğini öne sürmüştür.¹⁷³ Ayrıca nefrin mRNA düzeyinin proteinüri ile değil, glomerülosklerozun yaygınlığı ile orantılı olduğunu ve azalmış nefrin ekspresyonunun ağır proteinüriden çok yapısal glomerül bozukluğundan kaynaklandığını savunmuştur.¹⁷³

Ohashi ve arkadaşları insan membranöz nefropatisinde nefrin fosforilasyonunda değişiklik olup olmadığını ve fosforilasyonla proteinüri korelasyonunu araştırmışlardır. Yirmidört primer membranöz nefropati hastasıyla yapılan çalışmada immunfloresan mikroskopik ve immunelektron mikroskopik yöntemlerle fosforile nefrin (p-nefrin), total nefrin ve podosin ekspresyonlarına bakılmış, dört adet de kontrol böbrek kullanılmıştır.¹⁷⁴ Dördüncü evre membranöz nefropatide ayaksı uzantılar rejenere olunca, p-nefrin de eksprese olmaya başlamıştır, ancak ilk üç evre de fark görülmemiş ve proteinüri ile korelasyon bulunmamıştır.¹⁷⁴

Bizde membranöz nefropatide subepitelyal birikim ve aktin yoğunlaşmasının en fazla evre II'de olduğunu, hastalığın daha ileri evrelerinde birikimin rezorbe olduğunu, aktin yoğunlaşmasının da azaldığını gördük. Çalışmamızda aktin yoğunlaşmasının GBM'ın birikim olan bölgelerini bir şapka gibi sarması, aktin yoğunlaşması sayesinde podositin patolojik alanları tümüyle kaplamak veya sınırlamak gibi fonksiyonlarının olabileceğini düşündürdü. Birikimin rezorbe olduğu bölgelerde aktin yoğunlaşmasının azalması veya kaybolması da bu düşünceyi doğrular nitelikteydi.

Elena Gagliardini ve arkadaşları, kazanılmış glomerüler hastalığı olan hastalarda, proteinüri patogenezinde slit diafram bütünlüğünde nefrin ve CD2AP'nin rolünü araştırmışlardır.¹⁷⁵ Primer glomerüler hastalığı olan 28 hastada immunohistokimyal inceleme ve TEM ile morfolojik analiz yapmışlardır. IgA nefropatisi olanlarda nefrinin hücre dışı ekspresyonunun azaldığı, minimal

değişiklik hastalığı ve FSGS'de değişiklik olmadığı gösterilmiştir.¹⁷⁵ Hücre içi nefrin ve CD2AP ekspresyonunun da değişmediği bildirilmiştir. TEM ile yapılan morfolojik analizde slit porların sıklığı sayılmış, ve genişlikleri incelenmiştir, ayrıca slit içinde filamentöz yapının varlığı veya yokluğu araştırılmıştır.¹⁷⁵ Minimal değişiklik hastalığında slit por sıklığının kontrole göre belirgin azaldığı, IgA nefropatisinde değişmediği gösterilmiştir.¹⁷⁵ Slit diaframda filamentöz yapı minimal değişiklik hastalığında kontrol ile aynı bulunmuş, IgA nefropatisinde belirgin azaldığı tesbit etmişlerdir. Slit diafram genişliğinin ise her iki hastalıkta da azaldığını bildirmişlerdir.¹⁷⁵

FSGS ve MDH hastaların bulunduğu immunohistokimyasal çalışmada Koop K. ve arkadaşları CD2AP, nefrin ve podosin ekspresyonunu değerlendirmişlerdir.¹⁷⁶ Nefrin ve podosin ekspresyonunda azalma göstermişlerdir.¹⁷⁶ Elektron mikroskop ile ölçülen podosit genişliğinin nefrin ve podosin ekspresyon düzeyi ile negatif korelasyon gösterdiğini, proteinüri düzeyi ile de pozitif korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir.¹⁷⁶

Schmid ve arkadaşları proteinürik hastalarda nefrin ve podosin mRNA ekspresyonunu değerlendirmişler ve kontrol grubuna göre mRNA seviyesinde anlamlı bir artış saptamamışlardır. Ekspresyon düzeyleri ile serum kreatinin düzeyi ve proteinüri seviyesi arasında bir korelasyon tesbit etmemişlerdir.¹⁷⁷

MDH'da nefrin ekspresyonunun azaldığı bazı çalışmalarda bildirilmiştir.^{167,178,179} Puromisin aminonükleozid (PAN) nefropatisi genellikle MDH'nın modeli olarak kabul edilir, PAN tarafından indüklenen proteinürik durumlarda nefrin ekspresyon değişiklikleri incelenmiştir.¹⁸⁰ Nefrin mRNA seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. MDH'da nefrin boyanmasının granüler bir tarzdan glomerüler kapiller duvar boyunca uzanan lineer benzeri görünüme kadar değiştiği gösterilmiştir.¹⁸¹ PAN enjeksiyonundan hemen sonra nefrin mRNA ekspresyonu azalmış ve nefrinin immunohistokimyasal boyanmasında proteinüri pikinden hemen önce belirlenmiştir.¹⁸¹

Young Ki Lee ve arkadaşları PAN nefropatisi oluşturulmuş 20 sıçan ile , TEM ve IEM ile nefrin ekspresyonunu incelemişlerdir.¹⁸² Ayaksı uzantı genişliği 1. haftada kontrole göre daha fazlayken, sonra azalmıştır. Her 10.000 nm GBM uzunluğu için total altın partiküllerinin sayısına bakılmış, 1. haftada azaldığı,

sonra arttığını bildirilmişlerdir.¹⁸² Altın partikülleri 1. haftada sitoplazmada daha çok görüldüğünü belirlemişlerdir. Nefrin ekspresyonunun PAN nefrozda değiştiği ve pedisel düzleşmesinin buna paralel seyrettiğini belirtmişlerdir.¹⁸²

PAN nefropatisinde podosin ekspresyonu da incelenmiştir.¹⁷⁸ Podosinin normal glomerülde nefrin ile birbirine yakın olduğu oysa PAN nefropatisinde nefrinden açıkça ayrıştığı gösterilmiştir.¹⁷⁸ Bu bulgular MDH'da slit diaframda moleküler düzenlenmenin değiştiğini ve bununda proteinüri gelişimiyle ilişkili olduğunu düşündürmüştür.¹⁸¹

Pasif Heyman nefriti, deneysel membranöz nefropati modelidir, Yuan ve arkadaşları, pasif Heyman nefritinde nefrin ekspresyonunun değiştiğini, boyanmanın genişlediğini bildirmişlerdir.¹⁸³ Doublie ve arkadaşları membranöz nefropatili hastalarda nefrin boyanmasının granüler paterne kadar değiştiğini göstermişlerdir.¹⁷²

Nakatsue hem podosin hem de CD2AP'nin pasif Heyman nefritinde proteinürinin hemen öncesinde nefrinden ayrıştığını göstermiştir.¹⁵⁷ Membranöz nefropatide proteinüri gelişimine slit diafram disfonksiyonunun katkıda bulunduğunu ileri sürmüştür.¹⁸¹

Nefrin, podosin ve CD2AP ile bağlantılıdır ve bir kompleks oluştururlar. Bu kompleks slit diaframı aktin iskelete bağlayan fonksiyonel ünedir.¹⁸¹ Podosinin bazı ailesel FSGS vakalarında tanımlanması, slit diafram bölgesinde CD2AP varlığının gösterilmesiyle proteinürinin oluşumunun sadece nefrindeki değişikliklerle değil bu proteinlerin oluşturduğu hücre iskeletiyle de ilişkili olabileceği düşünülmüştür.¹⁸⁴

Horinouchi ve arkadaşları FSGS ve MDH'lı hastalarla yaptıkları çalışmada immunohistokimyasal olarak podosin ekspresyonu değerlendirmişlerdir.¹⁸⁵ MDH'da aktif dönem, remisyon dönemi olup olmaması veya tedavi alıp almaması dikkate alınmaksızın podosin ekspresyonunda azalma olmadığını belirtmişlerdir.¹⁸⁵ Fakat FSGS vakalarının %74'ünde podosin ekspresyonunda azalma göstermişlerdir.¹⁸⁵ Podosin ekspresyonunu değerlendirmenin MDH ve FSGS ayırıcı tanısında faydalı olabileceğini öne sürmüşlerdir.¹⁸⁵

P-Kaderin ile yapılmış çalışma sayısı oldukça azdır. P-Kaderin null farenin canlı olduğu görüldüğünden, bazı araştırmacılar tarafından filtrasyon bariyerinin bütünlüğü için önemli olmadığı düşünülmüştür.¹⁸⁶ Farklı kaderin isoformlarının eksprese edilmesinin de, podositlerde p-kaderin eksikliğini giderebileceği düşünülmüştür.¹⁸⁶ Kültüre podositlerin E-kaderin eksprese ettiğinin gösterilmesi bu fikri desteklemektedir.¹⁸⁶

Bizim çalışmamızda tüm hasta gruplarında, nefrin işaretlenmesinde kontrol grubuna göre azalma tesbit edildi. Kontrol grubu dışında en iyi işaretlenme MDH hasta grubundaydı, FSGS hasta grubunda MN hasta grubuna göre daha iyi işaretlenme vardı.

Anti-aktin antikoru ile yaptığımız immunelektron mikroskopik işaretlemeye; tüm hasta gruplarında aktin işaretlenmesinin kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi. Aktin yoğunlaşması görülen alanlarda, birikimlerin olduğu bölgelerin çevresinde ve desmozom benzeri yapıların etrafında aktin ekspresyonunun arttığı görüldü. Aktin ekspresyonunun en fazla olduğu grup MPGN hasta grubu olarak gözlemlendi, daha sonra gelen MN hasta grubu MDH hasta grubuna göre daha fazla işaretlenme göstermişti. Gruplar arasında en az işaretlenme FSGS hasta grubundaydı, ancak tüm gruplardaki işaretlenme kontrol grubuna göre daha fazla olarak değerlendirildi.

Yukarıda belirtilen proteinürük böbreklerle yapılan bazı çalışmalarda; nefrin ve podosin ekspresyonunun azalmasına rağmen CD2AP ekspresyonunun değişmediği, aynı kaldığı belirtilmektedir. Hatta nefrin, podosin ve CD2AP'nin oluşturduğu komplekste nefrin ve podosin bölümünde bozulmaya rağmen CD2AP'nin aktin iskeletle bağlantısının aynen korunduğu belirtilmektedir.¹⁸³ CD2AP'nin silinmiş ayaksız uzantılarda mikrofilamanların yapısında yoğunlaştığı bildirilmektedir.^{183,187}

Bizim çalışmamızda CD2AP'nin immunelektron mikroskopik işaretlenmesinde, bu çalışmaların aksine kontrol grubuna göre azalma gördük. Kontrole en yakın CD2AP işaretlenmesi olan grup MPGN hasta grubuydu.

MPGN hasta grubunda podosit ayaksız uzantıları da, diğer hasta gruplarına göre daha normale yakın durumdaydı. Nefrin ekspresyonundaki

azalmaya rağmen CD2AP'nin bu gruptaki ekspresyonu bize, nefrinden bağımsız olarak CD2AP'nin ayaksı uzantıların morfolojik yapılarının korunmasında etkili olduğunu düşündürdü. CD2AP'nin en az eksprese olduğu grup ise FSGS hasta grubu olarak gözlemlendi. Bu durum FSGS'de görülen proteinüride CD2AP'nin katkısı olabileceği kanısına varmamıza yol açtı.

Çalışmamızda ekspresyonunu değerlendirdiğimiz p-kaderin ile yapılan immünelektron mikroskopik işaretlemelerde; MN ve FSGS hasta gruplarında ekspresyonun azaldığı, MPGN ve MDH hasta gruplarında ise, azalmakla birlikte yine de kontrol grubuna yakın bir işaretlenme olduğu görüldü. Desmozomal sıkı bağlantıların daha fazla görüldüğü MDH hasta grubunda bir sıkı bağlantı bölgesi proteini olan p-kaderin ekspresyonunun bu bölgelerde devam ettiği düşünüldü.

Podosinin immünelektron mikroskopik işaretlenmesinde; MDH hasta grubunda nefrin kadar, hatta nefrinden daha iyi işaretlenme görüldü. MN hasta grubunda podosin işaretlenmesi azalmış olarak görüldü. MPGN hasta grubunda işaretlenme azalmıştı, ancak MN hasta grubuna göre daha iyi işaretlenme görüldü. FSGS hasta grubunda da podosin işaretlenmesi azalmıştı, işaretlenme MPGN hasta grubundan daha iyi olarak belirlendi. Minimal değişiklik hastalığında ayaksı uzantılarda silinmenin yaygın ve hızlı olmasına rağmen ayaksı uzantılarda ve slit diafram bölgesinde bulunan proteinlerin yapısının bozulmadan belli bir süre daha varlığını sürdürebildiği bu nedenle MDH hasta grubunda çalıştığımız proteinlerin ekspresyonlarının diğer hasta gruplarına göre daha iyi olduğu düşünüldü.

Çalışmamızda, morfolojik olarak yaygın pedisel düzleşmesi, filtrasyon yarıklarının sayısında azalma, daralma ve kapanmalara rağmen, çalıştığımız proteinlerin MDH hasta grubunda en iyi düzeyde eksprese olduğu görüldü. MDH hasta grubunda immunfloresan birikimi gösterilmemişti, ve hastaların tamamında tam remisyon sağlanmıştı. İmmun kompleks birikimin olmamasının prognoza olumlu etkisi olduğu düşünüldü. Ayrıca, pedisel düzleşmesi olsa da, SD'nin normal fonksiyon görmesi için görev yapan proteinlerin kontrol grubuna yakın düzeyde eksprese olması sayesinde, bir süre sonra yeniden ayaksı uzantıların ve SD'lerin oluşmasının, bu gruptaki hastaların tedaviye yanıtlarının

iyi olmasını ve tam remisyon durumunun oluşmasını sağlayabileceği kanısına varıldı. Bu nedenle bu proteinlerin ekspresyonunun, düzleşmenin reverzibl olup olmadığını değerlendirmede çok önemli kriterler olabileceği düşünüldü.

FSGS hasta grubu, glomerülün dejenere olmayan bölümlerinde sağlam görünümde filtrasyon yarıklarının bulunmasıyla dikkat çekmişti. Ancak immunelektron işaretlemeye protein ekspresyonlarının en az seviyede izlendiği gruplardan biri oldu, hastaların bazılarında immun kompleks madde birikimleri de gösterilmişti. Ayrıca tedaviye yanıt açısından da en kötü grup buydu. FSGS'nin oluşma mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, pek çok farklı durumun bu hastalığa yol açtığı sanılmaktadır. Bizim çalışmamızda da; SD'da görev alan proteinlerin ekspresyonlarının herhangi bir sebeple azalmasının, bazı bölgelerde morfolojik yapıyı çok bozmadan SD'ın normal fonksiyonlarını gerçekleştirmesini engelleyerek, normale dönüş mekanizmalarını bozduğunu düşündürdü. Bu nedenle, normal böbrek fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinde morfolojik görünümünden ziyade, SD yapısında görev alan proteinlerin doğru lokalizasyonda ekspresyonunun daha önemli olduğu sonucuna varıldı.

MN hasta grubu morfolojik görünümün en kötü olduğu gruptu, immunelektron işaretlemeye de en kötü ekspresyonun görüldüğü grup oldu, hastalarda granüler birikimler de gösterilmişti, ancak hastalarda tam ve kısmi remisyonlar bildirilmişti. Bu hastalık grubunda belirgin patoloji, çok sayıdaki subepitelyal granüler birikimlerdir. Podositlerde görülen düzleşme ve aktin yoğunlaşmasının tamamen bu duruma sekonder olarak geliştiği düşünüldü. Birikimlerin rezorbe olması ile podositte görülen değişikliklerin sona ermesi, bu durumun kanıtı olarak yorumlandı. Dolayısıyla birikimlerin ortadan kaldırılmasının, podositlerdeki değişiklikleri reverzibl olmasına, ve böylece hastaların tedaviye daha iyi yanıt vermesine neden olacağı sonucuna varıldı.

MPGN hasta grubunda morfolojik değerlendirmede özellikle podosit, ayaksız uzantılar ve filtrasyon yarığı bölgesi daha iyi olarak değerlendirilmişti, immunelektron işaretlenmede protein ekspresyonu açısından MDH hasta grubundan sonra geliyordu. Çoğunlukla mezangiyal lokalizasyonda granüler birikimler gösterilmişti, bir hasta dışında tüm hastalarda tedavi ile tam ve kısmi remisyonlar görülmüştü. Bu hastalık grubunda esas patolojinin mezangiyal

hücrelerde olması nedeniyle, podositlerde görülen değişikliklerin bu duruma sekonder olarak geliştiği düşünöldü. Ekspresyonlarını araştırdığımız proteinler, genel olarak FSGS ve MN hasta grubuna göre bu grupta daha iyi düzeydeydi. Dolayısıyla MDH hasta grubunda olduğu gibi, protein seviyelerinin daha iyi düzeyde olmasının, hastalığın tedavisinde iyi ve oldukça belirleyici bir etken olduğu sonucuna varıldı.

İmmunelektron mikroskopik yöntemle yapılan inceleme sonucunda, glomeröler filtrasyon bölgesi ve slit diaframların değerlendirilmesinde özellikle nefrin, podosin ve CD2AP'nin etkilerinin daha belirgin olduğu düşünöldü. Aktin ekspresyonu, ayaksa uzantıların iskeletinde bozulma ve bu bozulmaya verilen cevap açısından değerliydi. Slit diafram bölgesinin sıkı bağlantı formasyonuna değişimi açısından p-kaderin ekspresyonun da önemli olduğu düşünöldü.

Proteinüri ile giden böbrek hastalıklarının patogeneğinde ve tedaviye yanıt sürecinde; podositlerin, ayaksa uzantıların ve özellikle SD yapısının çok önemli olduğu; bu bölgedeki protein ekspresyonlarının yapının normale dönmesinde çok etkili olabileceği ve bu proteinlerin takibinin, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde yardımcı olabileceği sonucuna varıldı.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda proteinüri ile seyreden ve farklı klinik tanılar almış 20 glomerüler böbrek hastasının böbrek biyopsilerini transmisyon elektron mikroskopik olarak yeniden incelenerek daha detaylı morfolojik bulgular tesbit edildi ve bunlar kontrol grubu olarak seçtiğimiz nonproteinürik tübülointerstisyel nefritli hastaların bulgularıyla karşılaştırıldı. Aynı hastalar için slit diafram bölgesinde bulunan beş proteininin immunelektron mikroskopik ekspresyonları incelendi. Elde edilen sonuçlara göre:

1. Sadece pedisel silinmesi, filtrasyon yarığı kapanması gibi bulguların ön plana çıktığı minimal değişiklik hastalarında, detaylı incelemede morfolojik açıdan çok değerli bulguların olduğu görüldü. Klinik olarak en hafif glomerüler hastalıklardan biri kabul edilen minimal grubundaki bu değişikliklerin tesbitinin tamir sürecinin ve mekanizmasının anlaşılmasına ışık tutabileceği düşünüldü.

2. Membranöz glomerülonefrit hastalarında subepitelyal birikimlerin hastalığın tablosuna ve aktin iskeletteki olumsuz değişikliklere, SD protein ekspresyonuna etki ettiği düşünüldü.

3. MPGN grubu hastalarda patolojinin daha çok mezangiyal alan, bazal membran bölgesini etkilediği, ayaksı uzantılar, filtrasyon yarığı ve SD'ların daha az etkilendiği görüldü. Bu nedenle tablonun FSGS ve membranöz nefropati hastalarına göre göreceli olarak daha iyi olduğu düşünüldü.

4. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda belirtilen slit diaframların sıkı bağlantılardan köken aldığı, aslında modifiye olmuş sıkı bağlantılar olduğu ve nefropati sırasında eski yapısını kazanarak sıkı bağlantılara dönüştüğü iddialarına destek verecek bulgular elde edildi.

5. Bazı hastaların örneklerinin incelenmesi sırasında gördüğümüz bazal invaginasyonlar ve bunlarda filtrasyon yarığı yapısına dönüştüğü izlenimi veren görüntüler, tamir sürecinde bazal invaginasyonların da rolü olabileceğini düşündürdü.

6. Halen netlik kazanmayan proteinüri mekanizmasının, GBM'dan ayrılma alanlarından veya endositotik veziküllerle olduğu fikirleri değerlendirildiğinde;

bunların da mutlaka proteinüriye etki ettiği, ancak asıl etkenin slit diafram bölgesindeki moleküler değişiklikler olduğu düşüncesinin daha doğru olabileceği sonucuna varıldı.

7. Slit diafram bölgesindeki proteinler için yapılan immunelektron mikroskopik işaretleme çalışmalarının çok değerli olduğu, klinik tanı olarak aynı grupta yer alan hastalar için bile farklı bulgular elde edilebileceği, bu nedenle bu çalışmaların aynı hastanın elektron mikroskopik morfolojik değerlendirmeleriyle birlikte ele alınması gerektiği düşünüldü.

8. Slit diaframların sıkı bağlantılardan köken aldığı ve nefroz durumunda bunlara geri dönüştüğü fikrini irdelemek için p-kaderin yanında kavşak adezyon molekülü A (JAM-A), klaudin, ZO-1, occludin gibi diğer sıkı bağlantı proteinleriyle de çalışmanın faydalı olabileceği sonucuna varıldı.

9. Proteinürik böbrek hastalıklarının patogenezinin anlaşılması ve ayırıcı tanısının yapılabilmesi için immunelektron mikroskopik işaretleme yönteminin önemli olduğu, ancak tekniğin zorluğuna rağmen daha geniş hasta gruplarıyla çalışmanın gerekli olduğu düşünüldü.

KAYNAKLAR

- ¹ Huh W, Kim DJ, Kim MK, Kim YG, Oh HY, Ruotsalainen V, Tryggvason K. Expression of nephrin in acquired human glomerular disease. *Nephrol Dial Transplant* (2002) 17: 478–484
- ² Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K, Camussi G. Nephrin Redistribution on Podocytes Is a Potential Mechanism for Proteinuria in Patients with Primary Acquired Nephrotic Syndrome *Am J Pathol* (2001) 158:1723–1731
- ³ Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl)*. 1995;192(5):385–397.
- ⁴ Eremina V, Quaggin SE. Current opinion in nephrology and hypertension. 2004; 13(1):9–15. [PubMed: 15090854]
- ⁵ Ballermann, B.J. (2005) Glomerular endothelial cell differentiation. *Kidney Int.* 67, 1668–1671
- ⁶ Avasthi, P.S. and Koshy, V. (1988) Glomerular endothelial glycocalyx. *Contrib. Nephrol.* 68, 104–113
- ⁷ Puneet Garg¹ and Ton Rabelink² Glomerular Proteinuria: A complex interplay between unique players *Adv Chronic Kidney Dis.* 2011 July ; 18(4): 233–242. doi:10.1053/j.ackd.2011.06.001.
- ⁸ Abrahamson DR (1985) Origin of the glomerular basement membrane visualized after in vivo labeling of laminin in newborn rat kidneys. *J Cell Biol* 100:1988–2000
- ⁹ Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, St John PL. Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(7):1471–1479.
- ¹⁰ Miner JH. Developmental biology of glomerular basement membrane components. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1998;7(1):13–19.
- ¹¹ St John PL, Abrahamson DR. Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains. *Kidney Int.* 2001;60(3):1037–1046.
- ¹² Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD: Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. *N Engl J Med* 298: 826–833, 1978
- ¹³ Kanwar YS, Liu ZZ, Kashihara N, Wallner EI: Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria. *Semin Nephrol* 11: 390–413, 1991
- ¹⁴ Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K: Type IV collagen: Structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 268: 26033–26036, 1993
- ¹⁵ Yurchenco PD, O’Rear J: Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol* 6: 674–681, 1994
- ¹⁶ Hassel JR, Robey PG, Barrach HJ, Wilczek J, Rennard SI, Martin GR: Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4494–4498, 1980
- ¹⁷ Groffen AJ, Ruegg MA, Dijkman H, Van de Velden TJ, Buskens CA, Van den Born J, Assmann KJ, Monnens LAH, Veerkamp JH, Van den Heuvel LP: Agrin is a major heparan sulfatate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. *J Histochem Cytochem* 46: 19–27, 1998

-
- ¹⁸ Karnovsky MJ, Ainsworth SK: The structural basis of glomerular filtration. *Adv Nephrol* 2: 35–60, 1972
- ¹⁹ Latta H: The glomerular capillary wall. *J Ultrastruct Res* 32: 526–544, 1970
- ²⁰ Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: An update. *Anat Embryol. (Berl.)* 1995; **192**: 385–97.
- ²¹ Jeffrey H. Miner Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatr Nephrol* (2011) 26:1413–1417 DOI 10.1007/s00467-011-1785-1
- ²² Jaakko Patrakka and Karl Tryggvason. Nephrin a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *TRENDS in Molecular Medicine* Vol.13 No.9.2007
- ²³ Saxen L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol.* 1987;1(3):385–392.
- ²⁴ Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2007;17(9):428–437.
- ²⁵ Welsh GI, Saleem MA. The podocyte cytoskeleton – key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8(1):14–21.
- ²⁶ Endlich N, Kress KR, Reiser J, et al. Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(3):413–422.
- ²⁷ Jefferson JA, Alpers CE, Shankland SJ. Podocyte biology for the bedside. *Am J Kidney Dis.* 2011;58(5):835–845.
- ²⁸ Christian Faul, Katsuhiko Asanuma, Etsuko Yanagida-Asanuma, Kwanghee Kim and Peter Mundel. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *TRENDS in Cell Biology* Vol.17 No.9. 2007
- ²⁹ Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(1):1–8.
- ³⁰ Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol.* 2003;7(4):255–259.
- ³¹ Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:299–323.
- ³² Doyonnas, R. et al. (2001) Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. *J. Exp. Med.* 194, 13–27
- ³³ Asanuma, K. et al. (2005) Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J. Clin. Invest.* 115, 1188–1198
- ³⁴ Michaud, J.L. et al. (2003) Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 1200–1211
- ³⁵ Drenckhahn D, Franke RP. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab. Invest.* 1988; **59**: 673–82
- ³⁶ Kerjaschki D (2001) Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 108:1583–1587

-
- ³⁷ Mundel P, Shankland SJ (2002) Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 13:3005–3015
- ³⁸ Asanuma K, Kim K, Oh J *et al.* Synaptopodin regulates the actinbundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J. Clin. Invest.* 2005; **115**: 1188–98.
- ³⁹ Ichimura K, Kurihara H, Sakai T. Actin filament organization of foot processes in rat podocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 2003; **51**: 1589–600.
- ⁴⁰ Kaplan JM, Kim SH, North KN *et al.* Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* 2000; **24**: 251–6.
- ⁴¹ Michaud JL, Lemieux LI, Dube M, Vanderhyden BC, Robertson SJ, Kennedy CR. Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; **14**: 1200–11.
- ⁴² Asanuma, K. and Mundel, P. (2003) The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin. Exp. Nephrol.* 7, 255–259
- ⁴³ Rodewald, R. and Karnovsky, M.J. (1974) Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J. Cell Biol.* 60, 423–433
- ⁴⁴ Patari-Sampo A, Ihalmo P, and Holthofer H: Molecular basis of the glomerular filtration: nephrin and the emerging protein complex at the podocyte slit diaphragm. *Ann Med* 38: 483-492, 2006.
- ⁴⁵ Kestila, M. *et al.* (1998) Positionally cloned gene for a novel glomerular protein—nephrin—is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* 1, 575–582
- ⁴⁶ Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83: 253–307, 2003
- ⁴⁷ Reeves W, Caulfield JP, Farquhar MG: Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits: Sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion, and slit membranes in developing glomeruli. *Lab Invest* 39: 90–100, 1978
- ⁴⁸ Reeves WH, Kanwar YS, Farquhar MG: Assembly of the glomerular filtration surface. Differentiation of anionic sites in glomerular capillaries of newborn rat kidney. *J Cell Biol* 85: 735–753, 1980
- ⁴⁹ Caulfield JP, Reid JJ, Farquhar MG: Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. *Lab Invest* 34: 43–59, 1976
- ⁵⁰ Farquhar MG, Palade GE: Glomerular permeability. II. Ferritin transfer across the glomerular capillary wall in nephrotic rats. *J Exp Med* 114: 699–716, 1961
- ⁵¹ Lehtonen S, Ryan JJ, Kudlicka K, Iino N, Zhou H, Farquhar MG: Cell junction-associated proteins IQGAP1, MAGI-2, CASK, spectrins, and alpha-actinin are components of the nephrin multiprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9814–9819, 2005
- ⁵² Kos CH, Le TC, Sinha S, Henderson JM, Kim SH, Sugimoto H, Kalluri R, Gerszten RE, Pollak MR: Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest* 111: 1683–1690, 2003
- ⁵³ Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P: The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 11: 1–8, 2000

-
- ⁵⁴ Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG: The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 111: 1255–1263, 1990
- ⁵⁵ Kurihara H, Anderson JM, Kerjaschki D, Farquhar MG: The altered glomerular filtration slits seen in puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate-treated rats contain the tight junction protein ZO-1. *Am J Pathol* 141: 805–816, 1992
- ⁵⁶ Lehtonen S, Lehtonen E, Kudlicka K, Holthofer H, Farquhar MG: Nephrin forms a complex with adherens junction proteins and CASK in podocytes and in Madin-Darby canine kidney cells expressing nephrin. *Am J Pathol* 165: 923–936, 2004
- ⁵⁷ Hirotaka Fukasawa, Scott Bornheimer, Krystyna Kudlicka, and Marilyn G. Farquhar. Slit Diaphragms Contain Tight Junction Proteins. *J Am Soc Nephrol* 20: 1491–1503, 2009. doi: 10.1681/ASN.2008101117
- ⁵⁸ Mundel P, Reiser J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney Int* 2010;77(7):571-80.
- ⁵⁹ Schlondorff J. Nephrin AKTs on actin: The slit diaphragm-actin cytoskeleton signaling network expands. *Kidney Int* 2008;73(5):524-6.
- ⁶⁰ KATSUHIKO ASANUMA, ETSUKO YANAGIDA-ASANUMA, MIYUKI TAKAGI, FUMIKO KODAMA and YASUHIKO TOMINO. The role of podocytes in proteinuria. *NEPHROLOGY* 2007; 12, S15–S20. doi:10.1111/j.1440-1797.2007.00876.
- ⁶¹ Holthofer H: Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis. *Nephrol Dial Transplant* 22: 2124–2128, 2007
- ⁶² Huber TB, Hartleben B, Kim J, Schmidts M, Schermer B, Keil A, et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Mol Cell Biol* 2003;23(14): 4917–28.
- ⁶³ Jones N, Blasutig IM, Eremina V, Ruston JM, Blatt F, Li H, et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 2006;440(7085):818–23.
- ⁶⁴ Tryggvason K, Ruotsalainen V, and Wartiovaara J: Discovery of the congenital nephrotic syndrome gene discloses the structure of the mysterious molecular sieve of the kidney. *Int J Dev Biol* 43: 445–451, 1999.
- ⁶⁵ Ruotsalainen, V. et al. (1999) Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7962–7967
- ⁶⁶ Tryggvason, K. (1999) Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 2440–2445
- ⁶⁷ Wartiovaara, J. et al. (2004) Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J. Clin. Invest.* 114, 1475–1483
- ⁶⁸ Khoshnoodi, J. et al. (2003) Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions. *Am. J. Pathol.* 163, 2337–2346
- ⁶⁹ Nazım DENİZLİ, Yasemin KIRAÇ, Murat GÜCÜN, Recep DEMİRCİ, Murat DURANAY. Podositler ve Nefrotik Sendrom İçin Yeni Tedavi Hedefleri. *Yeni Tıp Dergisi* 2012;29(1):12-18
- ⁷⁰ Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J. Cell Biol.* 1990; **111**: 1255–63.

-
- ⁷¹ Kurihara H, Anderson JM, Farquhar MG. Diversity among tight junctions in rat kidney: Glomerular slit diaphragms and endothelial junctions express only one isoform of the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; **89**: 7075–9.
- ⁷² Schwarz K, Simons M, Reiser J *et al.* Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J. Clin. Invest.* 2001; **108**: 1621–9.
- ⁷³ Roselli S, Gribouval O, Boute N *et al.* Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am. J. Pathol.* 2002; **160**: 131–9.
- ⁷⁴ Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS. CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am. J. Pathol* 2001; **159**: 2303–8.
- ⁷⁵ Shih NY, Li J, Karpitskii V *et al.* Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2 associated protein. *Science* 1999; **286**: 312– 15.
- ⁷⁶ Shih NY, Li J, Karpitskii V *et al.* Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999; **286**: 312– 15.
- ⁷⁷ Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N. Engl. J. Med.* 2006; **354**: 1387–1401.
- ⁷⁸ Lenkkeri U, Mannikko M, McCready P *et al.* Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; **64**: 51–61.
- ⁷⁹ Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* 1998; **1**: 575–82.
- ⁸⁰ Kim JM, Wu H, Green G *et al.* CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 2003; **300**: 1298–300.
- ⁸¹ Boute N, Gribouval O, Roselli S *et al.* NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* 2000; **24**: 349–54.
- ⁸² Reiser J, Polu KR, Moller CC *et al.* TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat. Genet.* 2005; **37**: 739–44.
- ⁸³ Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL *et al.* A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005; **308**: 1801–4.
- ⁸⁴ Donoviel DB, Freed DD, Vogel H *et al.* Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol.* 2001; **21**: 4829–36.
- ⁸⁵ Philippe A, Weber S, Esquivel EL, Houbroun C, Hamard G, Ratelade J, *et al.* A missense mutation in podocin leads to early and severe renal disease in mice. *Kidney Int* 2008; **73**(9):1038–47.
- ⁸⁶ Fuchshuber A, Jean G, Gribouval O, Gubler MC, Broyer M, Beckmann JS, *et al.* Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25–q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis. *Hum Mol Genet* 1995; **4**(11):2155–8.
- ⁸⁷ Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, *et al.* NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; **24**(4):349–54.

-
- ⁸⁸ Schwarz K, Simons M, Reiser J, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest*. 2001;108(11):1621–1629.
- ⁸⁹ Patari-Sampo A, Ihalmo P, and Holthofer H: Molecular basis of the glomerular filtration: nephrin and the emerging protein complex at the podocyte slit diaphragm. *Ann Med* 38: 483-492, 2006
- ⁹⁰ Huber T B, Kottgen M, Schilling B, Walz G, and Benzing T: Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem* 276: 41543-41546, 2001
- ⁹¹ Huber TB, Schermer B, Benzing T. Podocin organizes ion channel lipid supercomplexes: implications for mechanosensation at the slit diaphragm. *Nephron Exp Nephrol*. 2007;106(2):e27–e31.
- ⁹² Roselli S, Heidet L, Sich M, et al. Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2004;24(2):550–560.
- ⁹³ Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*. 2000;24(4):349–354.
- ⁹⁴ Shih NY, Li J, Karpitskii V, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*. 1999;286(5438): 312–315.
- ⁹⁵ Jun Oh · Jochen Reiser · Peter Mundel. Dynamic (re)organization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* (2004) 19:130–137 DOI 10.1007/s00467-003-1367-y
- ⁹⁶ Huber TB, Kwok C, Wu H, et al. Bigenic mouse models of focal segmental glomerulosclerosis involving pairwise interaction of CD2AP, Fyn, and synaptopodin. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1337–1345.
- ⁹⁷ Kim JM, Wu H, Green G, et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science*. 2003;300(5623):1298–1300.
- ⁹⁸ Yaddanapudi S, Altintas MM, Kistler AD, et al. CD2AP in mouse and human podocytes controls a proteolytic program that regulates cytoskeletal structure and cellular survival. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3965–3980.
- ⁹⁹ Cho EA, Patterson LT, Brookhiser WT, Mah S, Kintner C, Dressler GR (1998) Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development. *Development* 125:803–812
- ¹⁰⁰ Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P (2000) The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 11:1–8
- ¹⁰¹ Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS (2003) Nephrin and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* 112:209–221
- ¹⁰² Eremina V, Baelde HJ, Quaggin SE. Role of the VEGF-a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier. *Nephron Physiol* 2007;106(2):32-3.
- ¹⁰³ Datta K, Li J, Karumanchi SA, Wang E, Rondeau E, Mukhopadhyay D. Regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF-A) expression in podocytes. *Kidney Int* 2004;66(4): 1471-8.

-
- ¹⁰⁴ Schlondorff D, Banas B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(6):1179–1187.
- ¹⁰⁵ Eremina V, Cui S, Gerber H, et al. Vascular endothelial growth factor A signaling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(3): 724–735.
- ¹⁰⁶ Banas B, Wornle M, Berger T, et al. Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis. *J Immunol.* 2002;168(9):4301–4307.
- ¹⁰⁷ Ding M, Cui S, Li C, et al. Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat Med.* 2006;12(9):1081–1087
- ¹⁰⁸ Kreidberg, J.A. (2000) Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 548–553
- ¹⁰⁹ Blattner, S.M. and Kretzler, M. (2005) Integrin-linked kinase in renal disease: connecting cell-matrix interaction to the cytoskeleton. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 14, 404–410
- ¹¹⁰ Kerjaschki, D. (2001) Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J. Clin. Invest.* 108, 1583– 1587
- ¹¹¹ Neal CR, Muston PR, Njegovan D, et al. Glomerular filtration into the subpodocyte space is highly restricted under physiological perfusion conditions. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(6):F1787–F1798.
- ¹¹² Salmon AH, Toma I, Sipos A, et al. Evidence for restriction of fluid and solute movement across the glomerular capillary wall by the subpodocyte space. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(6):F1777–F1786.
- ¹¹³ Lewis EJ, Schwartz MM, Pauli BU, Sharon Z. Endocytosis: a property of the glomerular visceral epithelial cell. *Nephron.* 1978;22(1–3):91–96.
- ¹¹⁴ Eyre J, Ioannou K, Grubb BD, et al. Statin-sensitive endocytosis of albumin by glomerular podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(2):F674–F681.
- ¹¹⁵ Mir S. *Nefrotik sendroma yol açan proteinüri mekanizması. Güncel Pediatri* 2006; 4(1): 34-5.
- ¹¹⁶ Akhtar M and Al Mana H: Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol* 11: 304-309, 2004
- ¹¹⁷ Jalanko H: Pathogenesis of proteinuria: lessons learned from nephrin and podocin. *Pediatr Nephrol* 18: 487-491, 2003
- ¹¹⁸ Lenkkeri U, Mannikko M, McCready P, Lamerdin J, Gribouval O, Niaudet PM, Antignac CK, Kashtan CE, Homberg C, Olsen A, Kestila M, and Triggvason K: Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet* 64: 51-61, 1999
- ¹¹⁹ D’Agati VD: Podocyte injury in focal segmental glomerulosclerosis: Lessons from animal models(a play in five acts). *Kidney Int* 73: 399-406,2008
- ¹²⁰ Kos CH, Le TC, Sinha S, Henderson JM, Kim SH, Sugimoto H, Kalluri R, Gerszten RE, Pollak MR (2003) Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest* 111:1683–1690
- ¹²¹ Orlando RA, Takeda T, Zak B, Schmieder S, Benoit VM, McQuistan T, Furthmayr H, Farquhar MG (2001) The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin. *J Am Soc Nephrol* 12:1589–1598

-
- ¹²² Asanuma, K. and Mundel, P. (2003) The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin. Exp. Nephrol.* 7, 255–259
- ¹²³ Shirato I, Sakai T, Kimura K, Tomino Y, Kriz W. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *Am. J. Pathol.* 1996; **148**: 1283–96.
- ¹²⁴ Mundel P and Shankland SJ: Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 13: 3005-3015, 2002
- ¹²⁵ Barisoni L and Mundel P: Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol* 23: 353-360, 2003
- ¹²⁶ Regele HM, Filipovic E, Langer B, Poczewski H, Kraxberger I, Bittner RE, and Kerjaschki D: Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis *J Am Soc Nephrol* 11: 403-412, 2000
- ¹²⁷ ANNE-TIINA LAHDENKARI, KARI LOUNATMAA, JAAKKO PATRAKKA, CHRISTER HOLMBERG, JORMA WARTIOVAARA, MARJO KESTILA", OLLI KOSKIMIES, and HANNU JALANKO. Podocytes Are Firmly Attached to Glomerular Basement Membrane in Kidneys with Heavy Proteinuria. *Am Soc Nephrol* 15: 2611–2618, 2004
- ¹²⁸ Whiteside C, Prutis K, Cameron R, Thompson J: Glomerular epithelial detachment, not reduced charge density, correlates with proteinuria in adriamycin and puromycin nephrosis. *Lab Invest* 61: 650–660, 1989
- ¹²⁹ Venkatachalam MA, Cotran RS, Karnovsky MJ: An ultrastructural study of glomerular permeability in aminonucleoside nephrosis using catalase as a tracer protein. *J Exp Med* 132: 1168–1180, 1970
- ¹³⁰ Messina A, Davies DJ, Dillane PC, Ryan GB: Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 126: 220–229, 1987
- ¹³¹ Trump BF, Benditt EP: Electron microscopic studies of human renal disease. Observations of normal visceral glomerular epithelium and its modification in disease. *Lab Invest* 11: 753–781, 1962
- ¹³² Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Kopp JB, Miner JH, Unanue ER, Shaw AS: CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 300: 1298–1300, 2003
- ¹³³ Asanuma K, Mundel P: The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol* 7: 255–259, 2003
- ¹³⁴ Puneet Garg and Ton Rabelink. Glomerular Proteinuria: A complex interplay between unique players. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2011 July ; 18(4): 233–242. doi:10.1053/j.ackd.2011.06.001
- ¹³⁵ Seiler MW, Rennke HG, Venkatachalam MA, Cotran RS. Pathogenesis of polycation-induced alterations (fusion) of glomerular epithelium. *Lab. Invest.* 1977; **36**: 48–61.
- ¹³⁶ Isao Shirato, Tatsuo Sakai, Kenjiro Kimura, Yasuhiko Tomino, and Wilhelm Kriz. Cytoskeletal Changes in Podocytes Associated with Foot Process Effacement in Masugi Nephritis. *American journal of Pathology*, Vol. 148, No. 4, April 1996
- ¹³⁷ Ryan GB, Rodewald R, Karnovsky MJ: An ultrastructural study of the glomerular slit diaphragm in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 33: 461–468, 1975

-
- ¹³⁸ Huifang Cheng!, Raymond C. Harris. The glomerulus – a view from the outside – the podocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (2010) 1380–1387
- ¹³⁹ Dr Ahmet A Kiykim Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji B D
- ¹⁴⁰ Kaysen GA. Plasma composition in the nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 1993; 13: 347-359
- ¹⁴¹ Wernerson A, Duner F, Petterson E, Widholm SM, Berg U, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Hultenby K, and Soderberg M. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 18: 70-76, 2003
- ¹⁴² Holt RC, Webb NJ, Ralph S, Davies J, Short CD, and Brenchley PE: Heparanase activity is dysregulated in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int* 67: 122-129, 2005
- ¹⁴³ Ostalska-Nowicka D, Zachwieja J, Maciejewski J, Wozniak A, and Salwa-Urawska W: The prognostic value of glomerular immaturity in the nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol* 19: 633-637, 2004
- ¹⁴⁴ Jenette JC, Olson JL, Schwartz MM, and Silva FG: *Pathology of the kidney*. Lippincott Williams&Wilkins, 2007
- ¹⁴⁵ Kitiyakara C, Kopp JB, Eggers P. Trends in the epidemiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003;23(2):172–182.
- ¹⁴⁶ D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, and Jennette JC: Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis* 43: 368-382, 2004
- ¹⁴⁷ Schonholzer KW, Waldron M, and Magi AB: Intraglomerular foam cells and human focal glomerulosclerosis. *Nephron* 62: 130-136, 1992
- ¹⁴⁸ Zimmerman SW: Increased urinary protein excretion in the rat produced by serum from a patient with recurrent focal glomerular sclerosis after renal transplantation. *Clin Nephrol* 22: 32-38, 1984
- ¹⁴⁹ Avila-Casado MC, Perez-Torres I, Auron A, Soto V, Fortoul TI, and Herrera-Acosta J: Proteinuria in rats induced by serum from patients with collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 66: 133-143, 2004
- ¹⁵⁰ Coward RJ, Foster RR, Patton D, Ni L, Lennon R, Bates DO, Harper SJ, Mathieson PW, and Saleem MA: Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes. *J Am Nephrol* 16: 629-637, 2005
- ¹⁵¹ Rivera F, Lopez-Gomez JM, Perez-Garcia R. Clinicopathologic correlations of renal pathology in Spain. *Kidney Int.* 2004;66(3):898–904.
- ¹⁵² Cybulsky AV. Membranous nephropathy. *Contrib Nephrol.* 2011;169:107–125.
- ¹⁵³ Jefferson JA, Nelson PJ, Najafian B, Shankland SJ. Podocyte disorders: Core Curriculum 2011. *Am J Kidney Dis.* 2011;58(4):666–677.
- ¹⁵⁴ Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 2009;361(1):11–21.
- ¹⁵⁵ Cybulsky AV, Quigg RJ, Salant DJ. Experimental membranous nephropathy redux. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(4):F660–F671.

-
- ¹⁵⁶ Zhang H, Cybulsky AV, Aoudjit L, et al. Role of Rho-GTPases in complement-mediated glomerular epithelial cell injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(1):F148–F156.
- ¹⁵⁷ Nakatsue T, Koike H, Han GD, et al. Nephritin and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2005;67(6):2239–2253.
- ¹⁵⁸ Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83: 253–307, 2003
- ¹⁵⁹ Vernier RL, Papermaster BW, Good RA: Aminonucleoside nephrosis. I. Electron microscopic study of the renal lesion in rats. *J Exp Med* 109: 115–126, 1959
- ¹⁶⁰ Ryan GB, Karnovsky MJ: An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 8: 219–232, 1975
- ¹⁶¹ Folli G, Pollak VE, Reid RT, Pirani CL, Kark RM: Electronmicroscopic studies of reversible glomerular lesions in the adult nephrotic syndrome. *Ann Intern Med* 49: 775–795, 1958
- ¹⁶² Churg J, Grishman E: Ultrastructure of glomerular disease: A review. *Kidney Int* 7: 254–261, 1975
- ¹⁶³ Yoshikawa N, Cameron AH, White RH: Ultrastructure of the non-sclerotic glomeruli in childhood nephrotic syndrome. *J Pathol* 136: 133–147, 1982
- ¹⁶⁴ Grishman E, Churg J: Focal glomerular sclerosis in nephrotic patients: An electron microscopic study of glomerular podocytes. *Kidney Int* 7: 111–122, 1975
- ¹⁶⁵ Inokuchi S, Shirato I, Kobayashi N, Koide H, Tomino Y, Sakai T: Re-evaluation of foot process effacement in acute puromycin aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 50: 1278 – 1287, 1996
- ¹⁶⁶ Srivastava T; Whiting JM, Garola RE, Dasouki MJ, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Hamed R, and Alon US: Podocyte proteins in Galloway-Mowat syndrome. *Pediatr Nephrol* 16: 1022-1029, 2001
- ¹⁶⁷ Furness PN, Hall LL, Shaw JA, and Pringle JH: Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1234-1237, 1999
- ¹⁶⁸ Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, Holmberg C, Heikinheimo M, Tryggvason K, and Jalanko H: Expression of nephrin in pediatric kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 12: 289-296, 2001
- ¹⁶⁹ Huh W, Kim DJ, Kim MK, Kim YG, Oh HY, Ruotsalainen V, and Tryggvason K: Expression of nephrin in acquired human glomerular disease. *Nephrol Dial Transplant* 17: 478-484, 2002
- ¹⁷⁰ Wernerson A, Duner F, Pettersson E, Widholm SM, Berg U, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Hultenby K, and Sodeberg M: Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 18: 70-76, 2003
- ¹⁷¹ Seiler MW, Rennke HG, Venkatachalam MA, and Cotran RS: Pathogenesis of polycation-induced alterations(“fusion”) of glomerular epithelium. *Lab Invest* 36: 48-61, 1977
- ¹⁷² Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K, and Camussi G: Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 158: 1723-1731, 2001

-
- ¹⁷³ Kim BK, Hong HK, Kim JH, and Lee HS: Differential expression of nephrin in acquired human proteinuric diseases. *Am J Kidney Dis* 40: 964-973, 2002
- ¹⁷⁴ Teiko Ohashi · Keiko Uchida · Yukari Asamiya · Yuki Tsuruta · Mayuko Ohno · Shigeru Horita · Kosaku Nitta. Phosphorylation status of nephrin in human membranous nephropathy. *Clin Exp Nephrol* (2010) 14:51–55 DOI 10.1007/s10157-009-0241-z
- ¹⁷⁵ Elena Gagliardinia Ariela Benignia Susanna Tomasonia Mauro Abbatea Raghu Kallurib Giuseppe Remuzzi. Targeted Downregulation of Extracellular Nephrin in Human IgA Nephropathy. *Am J Nephrol* 2003;23:277–286 DOI: 10.1159/000072281
- ¹⁷⁶ Koop K, Eikmans M, Baclde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, and Bruijn JA: Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 14: 2063-2071, 2003
- ¹⁷⁷ Schmid H, Henger A, Cohen CD, Frach K, Grone HJ, Schlondorff D, and Kretzler M: Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. *J Am Soc Nephrol* 14: 2958-2966, 2003
- ¹⁷⁸ Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Sakai T. Shimizu F: Cloning of rat homologue of podocin: expression in proteinuric states and in developing glomeruli. *J. Am Soc Nephrol.* 2003;14:46–56.
- ¹⁷⁹ Wernerson A, Dune´r F, Pettersson E, Widholm SM, Berg U, Ruotsalainen V, et al. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:70–6.
- ¹⁸⁰ Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Yaoita E, Orikasa M, Shia MA, et al. Cloning of rat nephrin: expression in developing glomeruli and in proteinuric states. *Kidney Int.* 2000;57:1949–61.
- ¹⁸¹ Hiroshi Kawachi, Koichi Suzuki, Naoko Miyauchi, Taeko Hashimoto, Yasuhiro Otaki, Fujio Shimizu. Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states: identification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome. *Clin Exp Nephrol* (2009) 13:275–280 DOI 10.1007/s10157-009-0162-x
- ¹⁸² Young Ki Lee, Taegun Kwon, Dae Joong Kim, Wooseong Huh, Yoon-Goo Kim, Ha-Young Oh and Hirashi Kawachi. Ultrastructural study on nephrin expression in experimental puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephrol Dial Transplant* (2004) 19: 2981–2986 doi:10.1093/ndt/gfh489
- ¹⁸³ Yuan H, Takeuchi E, Taylor GA, McLaughlin M, Brown D, Salant DJ. Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:946–56.
- ¹⁸⁴ Hara M, Yanagihara T, Takada T, Itoh M, Matsuno M, Yamamoto T, et al. Urinary excretion of podocytes reflects disease activity in children with glomerulonephritis. *Nephron.* 1998;18:35–41.
- ¹⁸⁵ Horinouchi I, Nakazato H, Kawano T, Iyama K, Furuse A, Arizono K, Machida J, Sakamoto T, Endo F, and Hattori S: In situ evaluation of podocin in normal and glomerular diseases. *Kidney Int* 64: 2092-2099, 2003
- ¹⁸⁶ Lenox, J.M. et al. (2000) Postnatal lethality of P-cadherin/desmoglein 3 double knockout mice: demonstration of a cooperative effect of these cell adhesion molecules in tissue homeostasis of stratified squamous epithelia. *J. Invest. Dermatol.* 114, 948–952
- ¹⁸⁷ Kriz W, Gretz N, Lemley KV: Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 54: 687–697, 1998

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MDH	Minimal değişiklik hastalığı
FSGS	Fokal segmental glomerüloskleroz
SD	Slit diafram
CD2AP	CD2 ilişkili protein
GBM	Glomerüler bazal membran
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
PAN	Puromisin aminonükleozid nefriti
NHERF	Sodyum-hidrojen değiştirici düzenleyici faktör
kDa	Kilo Dalton
TRPC6	Transient receptor potential cation channel 6
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
ILK	İntegrin bağlı kinaz
MPGN	Membranoproliferatif (Mezangiokapiller) glomerülonefrit
MN	Membranöz glomerülonefrit
SIRS	Soluble immun response supressor
PLA2R	Fosfolipaz A2 reseptör
TEM	Transmisyon elektron mikroskop
İEM	İmmunelektron mikroskopik

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa No
Tablo 1 (Bazı slit diafram proteinleri)	19
Tablo 2 (Primer glomerülonefrit tipleri)	32
Tablo 3 (Hasta Klinik ve Laboratuar Bilgileri)	42
Tablo 4 (Hastalık gruplarında SD protein ekspresyon değişiklikleri)	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No
Şekil 1 (Primer uzantılar ve terminal ayaksı uzantılar aktin iskeletinin gösterilmesi)	15
Şekil 2 (Podosit ayaksı uzantılarındaki kontraktıl apparatus ve apikal, bazal, ve slit diafram fonksiyonel bölgelerinin TEM ve şematik olarak gösterilmesi)	16
Şekil 3 (Nefrin molekülü ve slit diafram yapısının şematik olarak gösterilmesi)	17

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa No
Resim 1 (Glomerüler endotel fenestraları, GBM, podosit ayakları uzantıları ve slit diaframları gösteren TEM resim)	12
Resim 2 (Podosit hücre gövdesi, primer uzantılar, GBM'nı örten terminal ayakları uzantıları gösteren TEM resim)	14
Resim 3A-B (TEM Morfolojik Bulgular Kontrol Grubu)	43
Resim 4A-F (TEM Morfolojik Bulgular MDH Grubu)	45
Resim 5A-F (TEM Morfolojik Bulgular MN Grubu)	47
Resim 6A-F (TEM Morfolojik Bulgular MPGN Grubu)	48
Resim 7A-F (TEM Morfolojik Bulgular FSGS Grubu)	50
Resim 8A-F (Nefrin İEM Ekspresyon Bulguları Kontrol Grubu)	51
Resim 9A-D (Nefrin İEM Ekspresyon Bulguları MDH Grubu)	52
Resim 10A-D (Nefrin İEM Ekspresyon Bulguları MN Grubu)	53
Resim 11A-D (Nefrin İEM Ekspresyon Bulguları MPGN Grubu)	54
Resim 12A-F (Nefrin İEM Ekspresyon Bulguları FSGS Grubu)	55
Resim 13A-D (Aktin İEM Ekspresyon Bulguları Kontrol Grubu)	56
Resim 14A-B (Aktin İEM Ekspresyon Bulguları MDH Grubu)	57
Resim 15A-D (Aktin İEM Ekspresyon Bulguları MN Grubu)	58
Resim 16A-D (Aktin İEM Ekspresyon Bulguları MPGN Grubu)	59
Resim 17A-B (Aktin İEM Ekspresyon Bulguları FSGS Grubu)	60
Resim 18A-D (CD2AP İEM Ekspresyon Bulguları Kontrol Grubu)	61
Resim 19A-D (CD2AP İEM Ekspresyon Bulguları MDH Grubu)	62

Resim 20A-D (CD2AP İEM Ekspresyon Bulguları MN Grubu)	63
Resim 21A-D (CD2AP İEM Ekspresyon Bulguları MPGN Grubu)	64
Resim 22A-B (CD2AP İEM Ekspresyon Bulguları FSGS Grubu)	64
Resim 23A-F (P-Kaderin İEM Ekspresyon Bulguları Kontrol Grubu)	65
Resim 24A-D (P-Kaderin İEM Ekspresyon Bulguları MDH Grubu)	66
Resim 25A-B (P-Kaderin İEM Ekspresyon Bulguları MN Grubu)	67
Resim 26A-D (P-Kaderin İEM Ekspresyon Bulguları MPGN Grubu)	68
Resim 27A-D (P-Kaderin İEM Ekspresyon Bulguları FSGS Grubu)	69
Resim 28A-D (Podosin İEM Ekspresyon Bulguları Kontrol Grubu)	70
Resim 29A-F (Podosin İEM Ekspresyon Bulguları MDH Grubu)	71
Resim 30A-B (Podosin İEM Ekspresyon Bulguları MN Grubu)	72
Resim 31A-D (Podosin İEM Ekspresyon Bulguları MPGN Grubu)	72
Resim 32A-D (Podosin İEM Ekspresyon Bulguları FSGS Grubu)	73