

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PATOLOJİ

ANABİLİM DALI

**FARKLI KAYNAKLI SKUALEN'İN
İN VİVO PODOSİT HASARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

DR. RESMİYE IRMAK YÜZÜGÜLDÜ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: PROF.

DR. SÜLEN SARIOĞLU

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2020

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PATOLOJİ

ANABİLİM DALI

**FARKLI KAYNAKLI SKUALEN'İN
İN VİVO PODOŞİT HASARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. RESMİYE IRMAK YÜZÜGÜLDÜ

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: PROF. DR.
SÜLEN SARIOĞLU**

Bu proje Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi
tarafından 2018.KB.SAG.036 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
RESİM LİSTESİ	viii
EK LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	x
TEŞEKKÜR.....	xiii
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. GLOMERÜL HİSTOLOJİSİ.....	8
2.2. NEFROTİK SENDROM	12
2.3. PRİMER GLOMERÜLER HASTALIKLAR VE FOKAL SEGMENTAL GLOMERÜLOSKLEROZ	13
2.4. FSGS HİSTOPATOLOJİSİ	16
2.4.1. Glomerüler lezyonlar.....	16
2.4.2. İnterstisyum ve tübüller.....	17
2.4.3. Damar değişiklikleri.....	17
2.4.4. İmmünfloresan mikroskopi	17
2.4.5. Elektron mikroskopi	17
2.4.6. Morfolojik alt türler.....	17
2.5. PODOSİT HASARI VE FSGS PATOGENEZİ.....	20
2.5.1. Podositlerin genetik hastalıkları	24
2.5.2. Uyum mekanizmaları	24

2.5.3. Sıvısal (Humoral) Etkenler.....	25
2.5.4. Dolaşan-çözünebilir faktörler (Circulating Factor).....	26
2.6. FSGS TEDAVİSİ.....	27
2.7. FSGS PROGNOZU	28
2.7. SKUALEN, SKUALEN KAYNAKLARI VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR.....	29
2.8. ADRIAMİSİN İLE SIÇANLARDA OLUŞTURULAN FSGS MODELİ.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Sıçanlar ve Bakımları.....	33
3.2. FSGS Modelinin Oluşturulması.....	33
3.3. Kuyruk veninden adriyamisin enjeksiyonu	33
3.4. Skualen formlarının uygulaması	34
3.5. Deney grupları	34
3.6. Deney Süresince yapılan İncelemeler	35
3.7. Biyokimyasal incelemeler:.....	36
3.8. Histokimyasal boyamalar:.....	37
3.8.1. PAS (Periodic acid-schiff) Boyama Protokolü:	37
3.8.2. Gümüş metanamin (Silver-methenamine (P.A.S.M)) Boyama Protokolü:.....	37
3.8.3. Masson-Trikrom (light green) Boyama Protokolü:.....	38
3.8.4. Wilms tümör 1 proteini (WT-1) immünohistokimyasal boyaması:	38
3.9 Histopatolojik değerlendirme.....	39
3.9.1. Bowman kapsülü ve glomerüler yumak alan ölçümleri:.....	39
3.9.2. Glomerüler segmental skleroz skorlaması:	39
3.9.3. WT-1 immünohistokimya değerlendirilmesi:	40
3.9.4. İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulgularının değerlendirilmesi:	40
3.9.5. İnterstisyel enflamasyon ve tübüler hasar bulguların değerlendirilmesi:.....	41
3.9.6. Trombotik mikroangiopati (TMA) bulgularının değerlendirilmesi:	41
3.9.7. Vasküler yapılarda tıkalıcı arteriopati bulgularının değerlendirilmesi.....	42
3.10. İstatistik.....	42

4. BULGULAR	44
4.1. GRUPLAR ARASINDA VERİLERİN KARŞILAŞTIRILMASI	44
4.1.1. Vücut ağırlıkları:	44
4.1.2. Yem tüketimleri.....	47
4.1.3. Su tüketimleri	49
4.1.4. 14.gün idrar hacimleri ve idrar ölçütleri.....	50
4.1.5. 22. gün idrar hacimleri ve idrar ölçütleri.....	51
4.1.6.Kan analizleri	53
4.1.7.Böbrek ağırlıkları toplamı	55
4.1.8. Histopatolojik Bulgular	55
4.1.8.1. Grupların ortalama Bowman ve glomerüler yumak alanları:.....	58
4.1.8.2. Grupların PAS ve PAMS histokimyasal boyaları ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları	59
4.1.8.3. Grupların en yüksek segmental skleroz skorları.....	61
4.1.8.4. Grupların WT-1 değerleri.....	62
4.1.8.5. Grupların interstisyel enflamasyon ve tübüler hasar skorları.....	64
4.1.8.6. Grupların interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulguları.....	66
4.1.8.7. Grupların TMA bulguları	68
4.1.8.8. Grupların tıkaçıcı arteriopati bulguları:.....	69
4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULARIN, KAN VE İDRAR ÖLÇÜTLERİNİN BİRBİRLERİ İLE İLİŞKİLERİ.....	69
4.2.1. Kan analizlerinin kendi aralarında ilişkileri	69
4.2.2. Kan analizlerinin WT-1 değerleri ile ilişkileri	70
4.2.3. Kan analizlerinin segmental skleroz skorları ile ilişkileri.....	70
4.2.4. Kan analizlerinin Bowman ve glomerüler yumak alanları ile ilişkileri	71
4.2.5. Kan analizlerinin tübülointerstisyel alanda izlenen morfolojik bulgular ile ilişkileri	71
4.2.6. İdrar ölçütlerinin kendi aralarında ilişkileri	71
4.2.7. İdrar ölçütlerinin segmental skleroz skorları ile ilişkileri	72
4.2.7.1. 14. gün idrar ölçütlerinin segmental skleroz skorları ile ilişkileri.....	72

4.2.7.2. 22. gün idrar ölçütlerinin segmental skleroz skorları ile ilişkileri.....	73
4.2.8. İdrar ölçütlerinin WT-1 değerleri ile ilişkileri.....	73
4.2.9. İdrar ölçütlerinin Bowman ve glomerüler yumak alan ölçümlerinin ile ilişkileri...	74
4.2.10. İdrar ölçütlerinin tübüler ve interstisyel alanlarda izlenen morfolojik bulgular ile ilişkileri.....	75
4.2.10.1 Tübüler hasarlanma bulgularının idrar ölçütleri ile ilişkisi	75
4.2.10.2 İnterstisyel enflamasyon skorlarının idrar ölçütleri ile ilişkisi	75
4.2.10.3 İnterstisyel fibrozis bulgularının idrar ölçütleri ile ilişkisi	75
4.2.10.4 Tübüler atrofi bulgularının idrar ölçütleri ile ilişkisi.....	75
4.2.11. Kan ve idrar analizlerinin birbirleri arasındaki ilişkileri.....	76
4.2.11.1. Kan analizleri ile idrar proteinüri değerleri arasındaki ilişki.....	76
4.2.11.2. Kan analizleri ile idrar kreatinin değerleri arasındaki ilişki	76
4.2.11.3. Kan analizleri ile idrar üre değerleri arasındaki ilişki	76
4.2.12. Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki farkın; idrar-kan ölçütleri ve histopatolojik bulgular ile ilişkileri	77
4.2.12.1. Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki farkın idrar ve kan ölçütleri ile ilişkisi.....	77
4.2.12.2. Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki farkın histopatolojik bulgular ile ilişkisi.....	77
4.2.13. Böbrek ağırlıklarının kan ve idrar analizleri ile ilişkisi	78
4.2.14. Histopatolojik bulguların birbirleri arasındaki ilişkileri.....	78
4.2.14.1. PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamalarının kendi aralarında ve diğer histopatolojik veriler ile ilişkisi	78
4.2.14.2. En yüksek segmental skleroz skorlarının diğer histopatolojik veriler ile ilişkileri	79
4.2.14.3. Bowman ve glomerüler yumak alanlarının diğer histopatolojik veriler ile ilişkisi.....	80
4.3. ÖNEMLİ BULGULAR	81
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇLAR.....	105
7. KAYNAKLAR.....	107

8. EKLER:	122
Ek 1: DEÜ Multidisipliner Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onay Formu 122	
Ek 2: SQ-Z saflık oranını gösterir kromatografi sonucu	123

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: 2019 Türk Nefroloji Derneği Ulusal Uzlaşı raporuna göre ülkelerin kayıt sistemi çalışmalarına göre PGH ve nefrotik sendrom nedenleri (MN: Membranöz nefrit, IgAN: IgA nefriti, MDH: Minimal değişiklik hastalığı, MezGN: Mezengial Glomerülonefrit).....	5
Tablo 2: Yarık diyaframdaki major moleküller.....	10
Tablo 3: FSGS Nedenleri	14
Tablo 4: Sıçanların zaman içinde ağırlık değişimleri.....	46
Tablo 5: Sıçanların 24 saatlik yem tüketim miktarlarının zaman içindeki değişimi.....	48
Tablo 6: Sıçanların 24 saatlik su tüketim miktarlarının zaman içindeki değişimi	49
Tablo 7: Gruplardaki sıçanların 14. gün idrar hacimleri ve 24 saatlik idrar ölçütleri	51
Tablo 8: Gruplardaki sıçanların 22.gün idrar hacimleri ve 24 saatlik idrar ölçütleri ortalamaları	53
Tablo 9: Gruplardaki sıçanların kan analiz sonuçları.....	54
Tablo 10: Grupların böbrek ağırlıkları ortalamaları	55
Tablo 11: Gruplara göre histopatolojik değerlendirme sonuçları.....	55
Tablo 12: Grupların en yüksek segmental skleroz skor dağılımı	61
Tablo 13: Grupların skor ortalaması ve ölçümsel verilerinin ortalama ve std sapma değerleri	63
Tablo 14: Grupların interstiyel enflamasyon skor verileri	66
Tablo 15: Grupların tübüler hasar skor verileri	66
Tablo 16 : Grupların interstisyel fibrozis skor verileri	67
Tablo 17: Grupların tübüler atrofi skor verileri.....	68

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Glomerül yapısı (Prof. Dr. Sülen Sarioğlu'nun izniyle, Nefropatoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 2012)	8
Şekil 2: Glomerül kapiller lup şematik görünümü (Prof. Dr. Sülen Sarioğlu'nun izniyle, Nefropatoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 2012)	9
Şekil 3: Glomerül bazal membran, pencereli endotel, podosit, pedisel ve yarık diyaframın elektron mikroskobik görünümünü (Prof. Dr. Sülen Sarioğlu'nun izniyle, Nefropatoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 2012).....	9
Şekil 4: Zaman İçinde Grupların Ortalama Ağırlıklarındaki Değişim	47
Şekil 5: Grupların 14. gün idrar proteinüri ortalama değerleri arasındaki ilişki	50
Şekil 6: Grupların 14 ve 22. gün idrar miktarlarının ortalamaları arasındaki ilişki	52
Şekil 7: Grupların 22. gün idrar proteinüri değerleri arasındaki ilişki	52
Şekil 8: Grupların kan kreatinin değerleri arasındaki ilişki.....	54
Şekil 9: Grupların Bowman ve glomerüler yumak alan ortalamaları arasındaki ilişki	58
Şekil 10: Grupların PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skor ortalamalarının ilişkisi	59
Şekil 11: Grupların WT-1 değerlerinin ortalamaları arasındaki ilişki.....	63
Şekil 12: İlk-son ağırlıklar arasındaki fark ile tübüler hasar bulguları arasındaki ilişki	78
Şekil 13: Tübüler hasar bulguları ile PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları arasındaki ilişki	79
Şekil 14: Tübüler hasar bulguları ile Bowman ve glomerüler yumak alan ortalamaları arasındaki ilişki.....	81

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Tip varyant FSGS; PAS (X40), (Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu'nun arşivinden)	18
Resim 2: Kollapsing glomerülopati; A: H&E (X40), B: PAMS (X40), C: PAS (X40) (Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu'nun arşivinden)	20
Resim 3: PAS histokimyasında glomerüler segmental skleroz skorlaması	60
Resim 4: PAS histokimyasında glomerüler segmental skleroz skorlaması	60
Resim 5: PAMS histokimyasında glomerüler segmental skleroz skorlaması (X40)	61
Resim 6: Gruplara ait glomerüllerde immünhistokimyasal WT-1 boyanmaları (X40)	64
Resim 7: ADR uygulanan gruplarda izlenen interstisyel enflamasyon ve tübüler hasarlanma bulguları H&E (X10)	65
Resim 8: Hafif düzeyde izlenen interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulguları; Masson (X20)	67
Resim 9: TMA bulguları (x40)	69

EK LİSTESİ

Ek 1: DEÜ Multidisipliner Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onay Formu
122

Ek 2: SQ-Z saflık oranını gösterir kromatografi sonucu 123

KISALTMALAR

KNİ: Kalsinörin inhibitörleri

FSGS: Fokal Segmental Glomerüloskleroz

NS: Nefrotik sendrom

PGH: Primer glomerüler hastalık

SDBY: Son dönem böbrek yetmezliği

HİGN: Hızlı ilerleyen glomerülonefrit

TND: Türk Nefroloji Derneği

AİA: Asemptomatik idrar anomalileri

MAK: Membran atak kompleksi

CDK: Siklin bağımlı kinaz

G: Gauch birimi

İp: intraperitoneal

SQ: Squalene

Köpekbalığı karaciğeri kaynaklı: KK

S: Sayı

ADR: Adriyamin

Z: Zeytinyağı

BUN: Kan üre azotu

PAS: Periodik asit-schiff

H&E: Hematoksilen-Eozin

SLE: Sistemik Lupus Eritematozus

Ig: İmmunglobulin

CD2-AP: CD2- ilişkili (associated) protein

SS: Segmental skleroz

TRPC6: Geçici (Transient) reseptör potansiyel katyon kanalı tip-6

MN: Membranöz Nefrit

suPAR: Çözünebilir ürokinaz tip plazminojen aktivatör reseptör

aa: Aminoasit

kd: kilodalton

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı

HÜS: Hemolitik üremik sendrom

TTP: Trombotik trombositopenik purpura

TMA: Trombotik mikroanjiyopati

aHÜS: Atipik hemolitik üremik sendrom

ADAMTS13: Tip 1 motif 13 trombospodin tip disintegrin ve metalloproteinaz

BMP-7: Bone morfogenetik protein-7

ACE: Anjiotensin dönüştürücü enzim

GSH: Glutasyon

WT-1: Wilms tümör 1 proteini

PAMS: Gümüş metanamin

GBM: Glomerül bazal membran

nm: Nanometre

ZO-1: Zonula-okludens-1

NOS: Başka şekilde tanımlanmamış

CXCL12: Kemokin (C-X-C motif) ligand 12

DM: Diyabetes Mellitus

HT: Hipertansiyon

TGF- β : Transforming (dönüştürücü) büyüme faktörü β

PDGFR- β : Plaketalet kaynaklı büyüme faktör reseptörü β

FGF- β : Fibroblast büyüme faktörü β

IL: İnterlökin

NADP: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

mg: miligram

ROS: Reaktif oksijen derivelere

DA: Dopamin

CFU: Koloni faktör ünitesi (unit)

USA: Amerika Birleşik Devletleri

DEÜ: Dokuz Eylül Üniversitesi

TLR: Toll benzeri reseptör

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık tezimin her aşamasında yardım, destek ve bilgisini esirgemeyen, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Sülen Sarioğlu başta olmak üzere,

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Burçin Tuna ve uzmanlık eğitimim boyunca katkılarını esirgemeyen ve özveriyle tecrübelerini aktaran çok kıymetli tüm hocalarıma,

Tıpta uzmanlık öğrencileri ve tüm tıbbi patoloji çalışanlarına,

Sevgili annem Sevinç Irmak ve babam Şinasi Irmak'a,

Tanıdığım günden beri hep desteğim olan sevgili eşime ve Nehir'ime teşekkür ederim.

Resmiye IRMAK YÜZÜGÜLDÜ

ÖZET

FARKLI KAYNAKLI SKUALEN'İN İN VIVO Podosit HASARI ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Resmiye Irmak Yüzügüldü

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD.

resmiyeirmak@hotmail.com

Amaç: Podositler glomerüllerin visseral epitelyal hücreleri olup, süzme işlevinde önemli rolleri vardır. Podosit hasarı; minimal değişiklik hastalığı, fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS) ve diyabetik nefropati gibi proteinürik glomerülopatiler için ana mekanizmadır. Türkiye’de primer glomerüler hastalıkların ve nefrotik sendromun en sık nedenleri arasında; membranöz nefritin ardından, ikinci sırada yer alan FSGS tedavisinde tüm hastalarda remisyon sağlayabilen bir tedavi rejimi olmadığı gibi, remisyon sağlanan hastalarda tekrarlama oranı %40'lara kadar çıkabilmektedir. Skualen isoprenoid bir bileşik olup, köpek balığı karaciğeri ile zeytinyağı en önemli kaynaklarındandır. Skualen ile ilgili yapılan çalışmalar antioksidan ve antitümöral etkilerine odaklı olup; aşılarında adjuvan olarak, bazı hastalıklarda koruyucu ve önleyici etkileri nedeniyle, ayrıca ilaç ve gen taşıyıcısı olarak da çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu çalışma, köpek balığı karaciğer ve zeytinyağı kaynaklı skualenin, deneysel hayvan modelinde, podosit hasarı üzerindeki etkilerini biyokimyasal ve histopatolojik düzeyde araştırmayı hedeflemektedir.

Gereç ve yöntem: Benzer ağırlıklara (300-350 gr) sahip Wistar sıçanlar ile; kontrol, adriyamisin (ADR), zeytinyağı kaynaklı skualen (SQ-Z), köpek balığı kaynaklı skualen (SQ-KK), ADR ile birlikte SQ-Z ve ADR ile birlikte SQ-KK uygulanan toplam altı adet deneysel grup oluşturuldu. Sıçanlara intravenöz ADR (7,5 mg/kg) uygulamasından 1 hafta önce başlanıp, toplam 14 gün boyunca 0.4 ml/gün dozunda SQ (zeytinyağı veya köpek balığı kaynaklı) uygulandı. Adriyamisin uygulamasının yapıldığı gün deney 1. gün olarak kabul edilip, 14. günde ve sakrifikasyondan 1 gün önce 24 saatlik idrarları toplanarak idrar proteinüri, kreatinin ve üre; sakrifikasyon sırasında alınan kan örneklerinde ise kreatinin, kan üre nitrojeni (BUN), total protein ve albümin değerleri analiz edildi. Sıçanlar 23. günde sakrifiye edilerek, böbrek dokularından elde edilen kesitler, hematoxilen eozin (H&E), Periodik asit schiff (PAS), Masson Trikrom, Gümüş metanamin (PAMS) histokimya ve Wilms tümör 1 proteini (WT-1) immünohistokimya boyaları uygulanarak, ışık mikroskopisi ile

değerlendirildi. Tüm glomerüller incelenerek, segmental skleroz skor ortalamaları, en yüksek segmental skor değerleri, tübüler atrofi, interstisyel fibrozis ve enflamasyon, tübüler hasar bulguları, TMA bulguları, WT-1 ortalamaları, en yüksek / en düşük WT-1 değerleri araştırıldı. Morfometrik olarak analiz programı yardımı ile 50 adet glomerülün Bowman ve glomerüler yumak alan ölçümleri yapılarak, en yüksek alana sahip %25 glomerülün ortalama değerleri hesaplandı. Gruplar arası sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek, anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

Bulgular: Adriyaminin uygulamasına eklenen SQ-KK ve SQ-Z ile, sıçanların ishal bulgularının şiddetinde ve süresinde azalma, genel durumlarında iyileşme, hareketliliklerinde artma olduğu izlendi. Skualen eklenen sıçanların, serum kreatinin ve idrar proteinüri değerlerinde zeytinyağı kaynaklı skualen ile daha belirgin olmak üzere azalma gözlenirken; idrarda üre ve kreatinin atılımının arttığı, glomerüller segmental skleroz şiddeti / yaygınlığı, tübüler hasar ve interstisyel enflamasyon bulgularının varlığı/ şiddeti ile Bowman ve glomerüler yumak alanlarındaki küçülme miktarının azaldığı saptandı. Adriyaminin uygulamasına eklenen her iki kaynaklı skualen uygulaması ile, yine zeytinyağı kaynaklı skualen ile anlamlı olmak üzere ($p=0.031$); glomerüllerde podosit farklılaşma belirteci olan WT-1 pozitif hücre sayısında artış olduğu gösterildi. Ayrıca SQ uygulanan gruplarda daha az sayıda sıçanda tübuler atrofi ve interstisyel fibrozis gözlemlendi. Adriyaminin ile SQ-KK'nın birlikte uygulandığı sıçanların yarısında, yaygın ve şiddetli akut TMA bulguları ve erken ölüm dikkati çekti.

Sonuç: Çalışmamızda SQ-KK ve SQ-Z uygulanan sıçanlarda, biyokimyasal ve histopatolojik böbrek hasar bulgularının önemli kısmında iyileşme olduğu saptanmıştır. Ayrıca podositopatinin temel hasar mekanizması olduğu FSGS'de, son yıllarda podosit farklılaşması ve korunmasına yönelik yoğunlaşan çalışmalarla paralel şekilde, mevcut araştırmamızda skualen uygulaması ile spesifik podosit belirteci olan WT-1 pozitif hücre sayısında anlamlı düzeyde fazlalık saptanmış olması skualenin podosit hasarını azaltıyor olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Skualen, Zeytinyağı, Adriyaminin, Podosit

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Objective: Podocytes are visceral epithelial cells of glomeruli and have important roles in filter function. Podocyte damage is the main mechanism for proteinuric glomerulopathies such as minimal change disease, focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) and diabetic nephropathy. Among the most common causes of primary glomerular disease and nephrotic syndrome in Turkey; after membranous nephritis, FSGS takes the second place. In FSGS treatment, there is no treatment regimen that can provide remission in all patients, and the rate of recurrence can be up to 40% in patients with remission. Squalene is an isoprenoid compound, the main sources of which are shark liver and olive oil. Studies related to squalene are focused on antioxidant and antitumoral effects. Squalene is used as an adjuvant in vaccines, because of its protective and preventive effects in some diseases, and also in various fields as a drug and gene carrier. This study aims to investigate the effects of shark liver and olive oil-based squalene on podocyte damage in experimental animal model.

Materials and methods: Six experimental Wistar rat groups with similar weights (300-350 g) were created, with control, adriamycin (ADR), olive oil-derived squalene (SQ-Z), shark-derived squalene (SQ-KK), SQ-Z with ADR, and SQ-KK with ADR. Squalene (from olive oil or shark) was administered at a total dose of 0.4 ml / day for a total of 14 days to rats. One week after the start of SQ application to rats, intravenous ADR (7.5 mg / kg) was started. The day of the application of ADR was accepted as the first day of the experiment. Urine proteinuria, creatinine and urea values were analyzed by collecting 24-hour urine on the 14th day and 1 day before sacrifice. Creatinine, blood urea nitrogen (BUN), total protein and albumin values were analyzed in blood samples taken during sacrifice. Rats were sacrificed on the 23rd day. Sections obtained from the kidney tissues of rats were evaluated by light microscopy in hematoxylin eosin (H&E), Periodic acid schiff (PAS), Masson Trichrome, Silver metanamine (PAMS) histochemistry and Wilms tumor 1 protein (WT-1) immunohistochemistry stains. All glomeruli were examined, and the mean segmental sclerosis score, the highest segmental sclerosis score values, tubular atrophy, interstitial fibrosis and inflammation, tubular damage findings, TMA findings, mean number of WT-1 positive glomerular cells, the highest / lowest WT-1 values were investigated. Bowman and glomerular tuft area measurements of 50 glomeruli were measured with morphometric

analysis program, and the average values of 25% glomeruli with the highest area were calculated. The inter-group results were evaluated statistically and the significance level was accepted as $p < 0.05$.

Results: When SQ-KK and SQ-Z added to Adriamycin application, it was observed that the severity and duration of the diarrhea findings of the rats decreased, their general condition improved and their mobility increased. In rats supplemented with SQ, serum creatinine and urinary proteinuria decreased (more pronounced with olive oil-derived SQ), urine and creatinine excretion increased in urine, glomerular segmental sclerosis severity / extensiveness, tubular damage and interstitial inflammation findings / severity, and the amount of shrinkage in Bowman and glomerular tuft areas decreased. An increase in the number of WT-1 positive cells, which is a podocyte differentiation marker in glomeruli, has been shown in two different source squalene applications added to the Adriamycin application. This increase was significant with olive oil-derived squalene ($p = 0.031$). In addition, tubular atrophy and interstitial fibrosis were observed in a smaller number of rats in SQ- supplemented groups. Widespread and severe acute TMA findings and early death were noted in half of the rats in which Adriamycin and SQ-KK were administered together.

Conclusion: In our study, significant improvement in biochemical and histopathological kidney damage findings was found in rats treated with shark and olive oil-derived squalene forms. In addition, in parallel with the studies focused on podocyte differentiation and protection in FSGS, where podocytopathy is the main damage mechanism, the fact that a significant excess in the number of WT-1 positive cells, which is a specific podocyte marker, has been found in our current study supports that squalene may reduce podocyte damage.

Keywords: Squalene, Olive Oil, Adriamycin, Podocyte

1. GİRİŞ VE AMAC

Podositler glomerülün visseral epitelyal hücreleri olup glomerül işlevinde rol oynayan pedisel denilen çıkıntıları ile glomerül bazal membranlarına süzme işlevinde çok önemli destek sağlayan hücrelerdir. Normal podositler postmitotik hücreler olup, tek, düzenli nükleuslu, primer ve sekonder ayaklı çıkıntılarla kapiller lüplara tutunmuş olarak bulunurlar. Bu hücrelerin minimal lezyon hastalığı gibi podosit hasarı olan hastalıklarda zarar görmeleri, proteinüri ve nefrotik sendroma yol açmaktadır. Podosit hasarı; minimal değişiklik hastalığı (MDH), fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS) ve diyabetik nefropati gibi proteinürik glomerülopatiler için ana mekanizmadır. 2019 yılı Türk Nefroloji Derneği'nin Ulusal Uzlaş Raporu'na göre, Türkiye'de primer glomerüler hastalıkların (PGH) ve nefrotik sendromun en sık nedenleri arasında; membranöz nefritin (MN) ardından, sırasıyla %19,3 ve %19,7 oranları ile FSGS ikinci sırada yer almaktadır (Tablo-1). Ülkeler arası PGH ve NS nedenlerinin sıklıkları arasında görülen farkta, böbrek biyopsi alım endikasyonlarındaki değişikliklerin de önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Tablo 1: 2019 Türk Nefroloji Derneği Ulusal Uzlaş Raporuna göre ülkelerin kayıt sistemi çalışmalarına göre PGH ve nefrotik sendrom nedenleri (MN: Membranöz nefrit, IgAN: IgA nefriti, MDH: Minimal değişiklik hastalığı, MezGN: Mezengial Glomerülofrit)

Ülke	PGH'nin görülme yüzdelerine göre sıralama			Nefrotik sendrom nedenlerinin yüzdelerine göre sıralama		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.
Türkiye	MN (%28.8)	FSGS (%19.3)	IgAN (%17.2)	MN (%43.2)	FSGS (%19.7)	MDH (%10.3)
İtalya	IgAN (%43.5)	MN (%23.4)	FSGS (%13.1)	MN (%44.1)	FSGS (%16.9)	MDH (%16.7)
İspanya	-	-	-	MN	MDH	FSGS
İngiltere	IgAN (%38.8)	MN (%29.4)	MDH (%9.8)	-	-	-
Çekya	IgAN (%34.5)	MDH (%12.5)	MezGN (%11.3)	IgAN*	MN	FSGS
Japonya	IgAN (~%50)	-	-	MDH (%40)	MN (%35.6)	FSGS (%13)
Kuzey Kore	IgAN (%38.2)	MDH	MN	MDH (%38.5)	MN (%25.7)	IgAN (%11.1)
Çin	IgAN (%45.2)	MezGN (%25.6)	MN (%9.9)	-	-	-
Brezilya	FSGS (%29.7)	MN (%20.7)	IgAN (%17.8)	-	-	-
A.B.D.**	FSGS	IgAN	MN	FSGS	MN	MDH

Siyahi ırkta ve ABD'deki İspanyol kökenli popülasyonda ise proteinürinin ve PGH'nin en sık nedeni FSGS'dir (Tablo 1). Fokal segmental glomerüloskleroz'un klasik tanımında segmental mezangiyal matriks artışı ile birlikte kapiller tıkanma, skleroz, hiyalinoz, köpük hücreler ve segmental skarlaşma, Bowman kapsülü ile glomerüler yumak arasında yapışma vardır (1). Son yıllarda, FSGS lezyonlarına yol açtığı bilinen etkenlerin sayısında belirgin artış olmuştur. Bunun sonucu olarak bu süreçte FSGS'nin insidansı, başlangıç yaşı, klinik tablosu değişkenlik göstermiştir. Fokal segmental glomerüloskleroz, insanlarda yapılan böbrek biyopsilerinde en sık rastlanan glomerüler hasar tiplerinden birisidir (2,3).

Erişkin FSGS'li olgularda en iyi bilinen tedaviler steroid ve kalsinörin inhibitörleridir (KNİ). Diğer tedavi seçenekleri metil-prednisolon, siklofosfamid, ACE inhibitörleri, mikofenolat mofetil, rituksimab, abatacept, plazmaferez tedavileri veya doğal ACTH'dır. Birçok gözlemsel çalışma, proteinüride spontan veya tedavi ile remisyon sağlanmasının hastalık prognozunu iyileştirdiğini göstermiştir (4–6).

Günümüzde kortikosteroid ve bağışıklık baskılayıcı tedaviye direnç, son dönem böbrek yetmezliği (SDBY)'nin en güçlü öngörücüsü olarak kabul edilmektedir (6,7). Remisyon sağlanamayan hastalarda prognoz kötüdür; ortalama 5 yıl renal sağ-kalım %65 (%60-90) ve 10 yıllık sağkalım %30'dur (%25-56) (6,8–10). Bu nedenle FSGS'un tedavisi için yan etkisi düşük, etkinliği yüksek tedavi seçeneklerinin bulunması önemlidir.

Bir isoprenoid bileşeni olan skualen (C₃₀H₅₀), karaciğer ve deride sentezlenir ve köpek balığı karaciğeri ile zeytinyağı en önemli kaynaklarındandır. Skualen emülsiyonları aşılarda adjuvan olarak, kanser ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde koruyucu ve önleyici etkileri nedeniyle, ilaç ve gen taşıyıcısı olarak çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar iki grupta sınıflanabilir; bunlar skualenin antioksidan ve antitümör etkilerine ilişkindir. Antioksidan araştırmalar arasında ülseratif kolit, miyokard infarktüsü, Parkinson hastalığı, ilaç ve radyoterapi yan etkileri üzerinde etkinliği bulunmaktadır. Anti-tümör etkileri ise kolon, akciğer, meme, nöroblastom, deri kökenli skuamöz hücreli karsinom alanlarında araştırılmıştır (11).

Türkiye'nin 2014 yılında skualen üretiminde dünya sıralamasında 4. olmasına karşın (12) ülkemizden zeytinyağı kaynaklı bu bileşiğin etkisi ile ilgili araştırma bulunmamaktadır. Araştırmalar zeytinyağı üretiminde ön planda olan İspanya ve İtalya kökenli olup, diğer ülkeler ait çalışmalarda köpek balığı kaynaklı gibi diğer skualen kaynakları kullanılmıştır.

Adriyamin (ADR, doksurubisin) bir antineoplastik antibiyotiktir. Deneysel çalışmalarda sıçanlarda nefropati ve FSGS modeli oluşturmak için kullanılmaktadır.

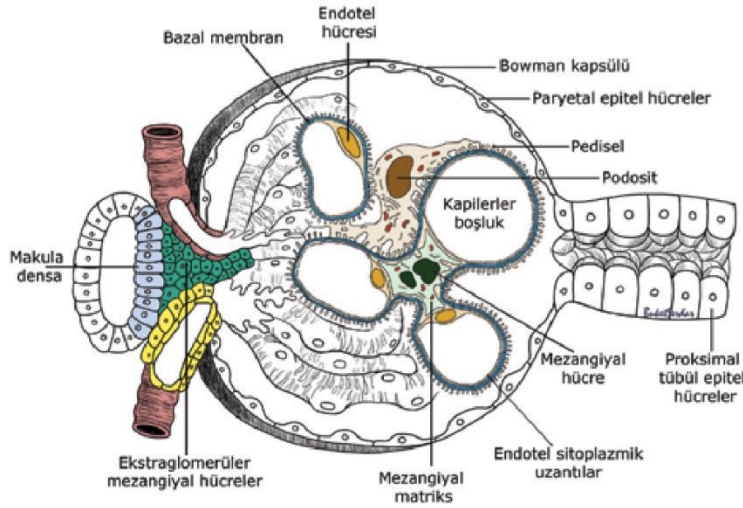
Bu çalışmada amacımız deneysel olarak oral uygulanan, köpek balığı karaciğer kaynaklı ve zeytinyağı kaynaklı olmak üzere 2 formdaki skualen solüsyonunun, adriyaminle FSGS oluşturulan sıçanlarda, klinik ve histopatolojik olarak etkinliğini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GLOMERÜL HİSTOLOJİSİ

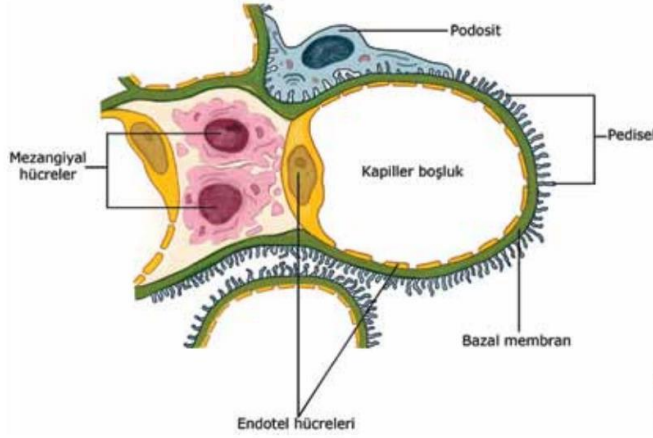
Glomerüller, iki epitelyal hücre tabaka ile çevrilmiş olan pencereci endotel ile döşeli anastomozlaşan kapiller yumaklardan oluşan, ortalama çapları 200 mikron olan özelleşmiş yapılardır. Afferent arteriol ile başlayan kapillerlerin dallanması ve efferent arteriol ile kapiller yumağı terk etmesi ile oluşur. Afferent ve efferent arterioller kapiller yumağa aynı bölgeden giriş-çıkış yaparlar. Arteriollerin giriş-çıkış bölgesine hilum, glomerülün bu bölgesine ise damarsal kutup adı verilir. Glomerülün, Bowman boşluğunda depolanan infiltratın damarsal kutbun karşısında yer alan, proksimal tübüle geçtiği açıklığa ise tübüler kutup adı verilir (Şekil-1) (13).

Şekil 1: Glomerül yapısı (Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu'nun izniyle, Nefropatoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 2012)

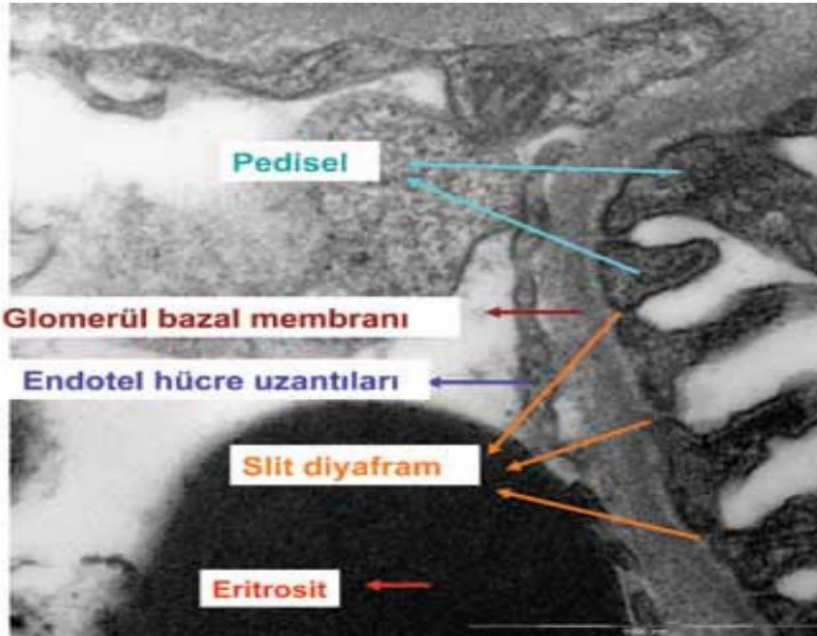


Viseral epitelyal hücreler (podositler) kapiller duvarın intrinsik bir komponentidir ve endotel hücrelerinden bazal membran ile ayrılır. Parietal epitel ise Bowman kapsülün üzerinde bulunur ve plazma filtratının ilk depolandığı yer olan üriner boşluğu çevreler (Şekil-1) (14). Bowman kapsülü parietal epitel hücreleri ve onların bazal membranından oluşur.

Şekil 2: Glomerül kapiller lup şematik görünümü (Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu'nun izniyle, Nefropatoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 2012)



Şekil 3: Glomerül bazal membran, pencereyi endotel, podosit, pedisel ve yarıklı diyaframın elektron mikroskopik görünümünü (Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu'nun izniyle, Nefropatoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 2012)



Glomerüller kapiller duvar filtrasyon membranı olup, aşağıda sıralanan yapılardan oluşur (Şekil-2 ve 3).

1. Pencereleli endotel hücreleri: Her pencere yaklaşık 70 -100 nm çapındadır. Normal glomerüller, pencereleli endotele sahip olmalarından dolayı su ve küçük çaplı moleküllere yüksek düzeyde geçirgen olup, albümin ve daha büyük çaplı proteinlere ve anyonik moleküllere karşı geçirgen değildir.

2. Glomerüler bazal membran (GBM): Kalın elektron yoğun materyalden oluşan santral *lamina densa* tabakası ile *lamina rara interna* ve *lamina rara externa* denilen daha ince elektron lusen periferik tabakalardan oluşur. GBM, kollajen (baskın olarak tip IV), laminin, polianyonik proteoglikanlar (baskın olarak heparan sülfat), fibronektin, entaktin ve çeşitli diğer glikoproteinlerden oluşan içeriğe sahiptir. Tip IV kollajen diğer glikoprotein (laminin, entaktif gibi) ve proteoglikanların (heparan sülfat, perlekan gibi) tutunmaları için yapısal bir ağ oluşturur. Bu yapısal komponentlerin biyokimyasal özellikleri glomerüler hastalıkları anlamak için kritik role sahiptir. Örneğin kollajeni oluşturan monomerlerin C terminalinde bulunan ve heliks formasyonunun oluşumunda önemli rolü olan globuler kollajenöz olmayan domaini (NC1) anti-GBM nefritindeki antikorlar için hedefdir. Kollajen monomerlerini oluşturan α zincirini kodlayan genlerdeki genetik defektler nedeniyle bazı herediter nefritler gelişir. GBM'nın proteoglikan içeriği geçirgenliğe etki edebilir (15).

3. Viseral epitelyal hücreler (podositler): GBM'nın lamina rara eksterna kısmına gömülü olan uzantılar içerirler. Ayaksı çıkıntılar ile GBM bağlantısı, GBM'da yer alan integrin ve distroglikan yüzey reseptörleri ile olur. Ayaksı çıkıntılar 20-30 nm genişliğindeki filtrasyon yarıkları ile ayrılmışlardır. Bu yarıklar, diyafram denilen yapılar ile köprüleşirler (Şekil-3). Podositler GBM komponentlerinin büyük kısmının sentezinden sorumlu hücreler olup, glomerül bariyer fonksiyonunun devamlılığı için önemlidir. Yarık diyaframlar proteinlerin filtrasyonuna karşı, boyut seçici distal difüzyon bariyeri oluştururlar (16). Yarık diyaframda bulunan başlıca moleküller Tablo 2 de sıralanmıştır (17).

Tablo 2: Yarık diyaframdaki major moleküller

Molekül	Boyut	Gen	Fonksiyon
Nefrin	1241 aa	NPHS1	Ig F süper aile üyesi Band
Podosin	383 aa	NEPH2	7 stomatin aile üyesi

CD2AP	639 aa	CD2AP	Adaptör protein
ZO-1(Zonula okludens-1)	1736 aa	TJP1	Membran protein
Neph 1	757 aa	KIRREL	Membran protein
FAT1	500 kd	FAT	Büyük protokadherin
P-cadherin	829 aa	CDH3	Membran protein

Nefrin: NPHS1 geni ile kodlanan yarık diyaframdaki ana transmembran protein olup, immunglobulin (Ig) benzeri büyük ekstraselüller domainlere sahiptir. Komşu ayaklı çıkıntılar arasında uzanıp, yarık diyafram boyunca dimerize olurlar. Ayaklı çıkıntıların sitoplazmasında podosin, CD2-ilişkili protein (CD2-AP) ve hücre iskeletinin aktin filamanları ile moleküler bağlantıları vardır.

Podocin: Sadece böbrekte ifade olup, yarık diyafram ile ayaklı çıkıntıların birleşme yerinde bulunur. Sinyalizasyonda görev alır.

CD2AP (CD2 ilişkili protein): İlk olarak T lenfositlerde CD2 reseptör proteini olarak bulunmuştur (18). Hücre içi protein olup, böbrekte podositlerde, proksimal, distal ve toplayıcı tübüllerde ifade edilir. Nefrin ile aktin iskeleti arasında bağlantı görevi görür.

ZO-1 (Zonula-okludens-1): Podositlerde, tübüler ve endotelial hücrelerde sentezlenir. Podocin gibi yarık diyafram ile ayaklı çıkıntıların birleşme noktasında bulunur. Neph1 ve aktin filamanları ile etkileşimde bulunur.

Neph1: Böbrekte sadece podosit- yarık diyafram bölgesinde bulunur. Nefrin gibi, Ig süper ailesi üyesidir transmembran proteindir. İntraselüler bölgesi podocin ve ZO-1 ile, ekstraselüler bölgesi nefrin ile etkileşim halindedir.

Alfa aktinin-4 (ACTN-4): Spektrin süper ailesi üyesi olup, aktin filamanlarının çapraz bağlanmasında görev alan proteindir. Sinaptopodin ile ilişki kurarak, podosit ayaklı çıkıntılarında hücre iskeletinin stabilizasyonunda, sinyalizasyonda ve kontraktilitesinde görev alır (19,20). Ayrıca podositlerde bulunan sıkı bağlantı (tight junction) proteinlerinden MAGI-1 ile de etkileşime girer.

TRPC6 (Geçici (Transient) reseptör potansiyel katyon kanalı tip-6)): TRP kanallarının

mekanosensör, iyon homeostazı, hücre büyümesi ve fosfolipaz C bağımlı hücre içi kalsiyum girişi gibi birçok biyolojik işlevleri vardır. TRPC6 vücutta geniş dağılım gösterir ve podosit hücrelerinde ve yarık diyaframda da bulunur (21).

4. Mezengial hücreler ve mezengial matriks: Tüm glomerüler yumak, kapillerler arasında bulunan mezengial hücreler tarafından desteklenir. Mezengial hücreler mezengial matriks adı verilen bazal membran benzeri alana gömülü olarak bulunurlar (Şekil-2). Mezengial hücreler mezenkimal kökenli olup, kontraktilite, fagositoz, proliferasyon, matriks ve kollajen sentezleme ve çeşitli biyolojik aktif araçlar sekrete etme yetenekleri vardır. Bu hücreler biyolojik olarak en fazla vasküler düz kas hücreleri ve perisitlere benzerlik göstermekte olup, birçok glomerülonefrit formunda önemli rolleri vardır.

2.2. NEFROTİK SENDROM

Nefrotik sendrom; 3.5 g/gün ve üzerinde proteinüriyle birlikte ödem, hipoalbuminemi, hiperlipidemi ve lipidüri olması olarak tanımlanmaktadır. Glomerüler kapiller duvarlarında oluşan hasar sonucunda, plazma proteinlerine karşı geçirgenliğin artması nedeni ile oluşur. Yetişkinlerde en sık sekonder nedeni diyabetes mellitus iken, primer olarak en sık nedenleri FSGS ve membranöz nefropatidir (22). Diğer en sık sekonder nedenler amiloidoz ve Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) dur.

Jeneralize ödem çok eski çağlardan beri bilinmektedir ve ilk olarak Hipokrat tarafından belgelenmiştir. Ancak nedenleri arasında bir sınıflama yapılmamıştır. Theodore Zuinger 1722’de idrar çıkışının azaldığını kaydetmiş ve bu durumu “böbreğin tübüllerinin tıkanması ve sıkışması” olarak tanımlamıştır. Böylece patolojinin böbrekte olduğu bulunmuş ve kronik böbrek yetmezliğinin bir nedeni olarak hastalığın klinik önemi vurgulanmıştır (23). Nefrotik sendrom terimi ise ilk olarak 1929’da Henry Christian tarafından kullanılmıştır (24). Steroid döneminden önce NS’un mortalitesi %67 iken, 1950 yıllarında antibiyotiklerin ve steroidlerin bu hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanması ile mortalitesi %9’a kadar gerilemiştir (25).

NS erişkin yaş grubunda büyük oranda sekonder nedenlerle meydana gelirken; çocuklarda genellikle altta yatan bir sebep olmaksızın primer olarak gelişir. Bu hastaların büyük çoğunluğunda neden belirsizdir (idiopatik) (26). Yetişkinlerde en sık sekonder nedeni

diyabetes mellitus iken, primer olarak en sık nedenleri FSGS ve membranöz nefropatidir (22). Diğer en sık sekonder nedenler amiloidoz ve SLE'dir.

NS'da daha çok inflamatuvar olmayan hasar rol alır ve immün hücrelerin glomerülü infiltre etmediği immün aracılıklı hasar nedeniyle oluşur. Bunun tipik örnekleri MDH, FSGS ve MN'dir. NS'de immün saldırının hedefi podositlerdir. Başlangıçtaki etki geçirgenliği artıran ve böylece masif proteinüriye neden olan GBM'nin bozulmasıdır.

MN, MDH, FSGS gibi NS'a neden olan hastalıklarda podositlerde ifade olan antijenlere antikorların bağlanması, komplemanın aktive olmasına ve membran atak kompleksi (MAK)'nin podosit membranı üzerinde sublitik konsantrasyonlarda birikmesine neden olur. Subepitelyal alanda kompleman birikimi tipik olarak sublitiktir çünkü faktör H, CD55, MAK inhibitör proteini (CD59) ve membran kofaktör proteininin (CD46) koruyucu etkileri mevcuttur. MAK'nin sublitik miktarları prostaglandin ve proteazların salınımını uyarır ve NADPH oksidaz sistemini aktive eder, ortamda oksijen radikalleri oluşur. Bu moleküller komşu GBM'yi parçalar ve endoplazmik retikülüm stresini artırarak, nefrin yeniden dağılımına neden olur ve DNA'ya hasar vererek, hücre döngüsünü durdurup apoptosise sebep olarak podosit hasarına neden olur.

Subepitelyal alan çok özellikli bir alandır ve her ne kadar kompleman bu alanda aktive olsa da, NS ile giden diğer glomerüler hastalıklarda ve MN'de oluşan lezyonlar yangısal değildir. Çünkü yangısal hücreler vasküler alandan buraya geçemez. Bunun nedeni immün hücrelerin sağlam GBM'yi etkin bir şekilde geçememesidir. Ayrıca subepitelyumda üretilen C3a ve C5a, yangısal atıvar hücreleri kapiller lümeninden buraya toplamaya yetecek kimyasal gradiente ulaşamaz. Sonuçta, subepitelyumda oluşan hasarın önemli bir kısmı terminal kompleman komponentleri olan MAK'nin podositler üzerindeki etkisinden kaynaklanmaktadır.

2.3. PRİMER GLOMERÜLER HASTALIKLAR VE FOKAL SEGMENTAL GLOMERÜLOSKLEROZ

Primer glomerüler hastalıklar (PGH), SDBY'nin önemli nedenlerinden biridir. T.C. Sağlık Bakanlığı ve Türk Nefroloji Derneği (TND) 2017 ortak raporuna göre glomerülonefritler (GN) hemodiyaliz hastalarının %6'sında, böbrek nakli hastalarının ise %11,7'sinde SDBY nedeni olarak gözükmektedir. TND Glomerüler Hastalıklar Çalışma

Grubu'nun gerçekleştirdiği çok merkezli çalışmasının henüz yayınlanmamış güncel verilerine göre Türkiye'de en sık görülen PGH, IgAN'dir (%25,7). İkinci sırayı %25,6 ile MN, üçüncü sırayı %21,9 ile FSGS almaktadır. En sık biyopsi endikasyonu NS iken (%51,7), bunu asemptomatik idrar anomalileri (AİA) (%18,3) ve hızlı ilerleyen glomerülonefritin (HİGN) de dahil olduğu nefritik sendrom (%17,8) izlemektedir.

Glomerüler hastalıklarda hasar daha çok endotel, GBM ve podositin oluşturduğu filtrasyon bariyerinde görülür. Bu bariyer molekül boyutu ve elektrik yüküne göre selektif bir bariyer olarak çalışır ve her tabakası plazma ultrafiltratının oluşumunda özel bir rol üstlenir. Endotelde çok sayıda fenestre bulunduğundan sitokinler, kemokinler, antikorlar, kompleman ve 50-100nm'den küçük çaplı diğer moleküller bu tabakayı geçebilir.

Primer (idiyopatik) FSGS ve sekonder FSGS olarak sınıflandırılabilir ve ayrımları prognoz ve tedavi açısından önemlidir. İdiyopatik FSGS, sekonder FSGS'nin ayırt edilebilir diğer tüm nedenlerinin dışlanması olarak tanımlanır (27,28). Ülkemizde biyopsiyle tanı konulan hastalarda en sık başvuru tablosu %61 ile NS'dir. SDBY riski genellikle yüksektir. Primer FSGS klinik ve patolojik bir tanıdır. Patolojik tanı; FSGS'nin morfolojik spektrumu içinde yer alan glomerüler lezyon gerektirir. Ayrıca; glomerulonefrite, glomerülleri tutan bir sistemik hastalığa ya da glomerüler immün kompleks birikimine dair kanıt olmamalıdır. Klinik tanı için ise hastada bilinen bir sekonder FSGS nedeni, glomerülonefrit öyküsü ya da segmental glomerüler yaralanmaya yol açabilecek bir sistemik hastalık olmamalıdır.

Fokal segmental glomerüloskleroz'un nedenleri Tablo 3'de listelenmiştir ve hastanın fizik muayenesi, tıbbi öyküsü, aile öyküsü, renal görüntüleme ve elektron mikroskopisi çalışmaları da dahil olmak üzere böbrek patolojisi ile ayrıntılı değerlendirilmelidir (27).

Tablo 3: FSGS Nedenleri

İdiyopatik (primer) FSGS

Sekonder FSGS

1. Ailesel
 - a) α -aktinin 4 mutasyonları
 - b) NPHS1 (nephrin) mutasyonları
 - c) NPHS2 (podopsin) mutasyonları

- d) WT-1 mutasyonları
- e) TRPC6 mutasyonları
- f) SCARB2 (LIMP2) mutasyonları
- g) INF2 (formin) mutasyonları
- h) CD2-ilişkili protein mutasyonları
- i) Mitokondriyal sitopatiler
- 2. Virüs ilişkili
 - a) HIV-ilişkili nefropati
 - b) Parvovirus B1
- 3. İlaçlar
 - a) Eroin nefropatisi
 - b) İnterferon- α
 - c) Lityum
 - d) Pamidronat/alendronat
 - e) Anabolik steroidler
- 4. Glomerüler hipertrofi veya hiperfiltrasyon aracılığıyla oluşmuş yapısal işlevsel yanıtlar
 - a) Azalmış böbrek kitlesi
 - i) Tek taraflı böbrek agenezi
 - ii) Oligomeganeфри
 - iii) Böbrek displazisi
 - iv) Kortikal nekroz
 - v) Reflü nefropati
 - vi) Cerrahi olarak böbreklerin çıkarılması
 - vii) Kronik allograft nefropatisi
 - viii) İşlevsel nefron sayısında azalmaya yol açan ağır böbrek hastalığı
- b) Başlangıçta normal böbrek kitlesi
 - i) Diyabetes mellitus
 - ii) Hipertansiyon
 - iii) Obezite
 - iv) Siyanotik konjenital kalp hastalığı
 - v) Orak hücreli anemi

5. Malignite (lenfoma)
6. Glomerüler hastalıklarda böbrek skarının neden olduğu, spesifik olmayan FSGS
 - a) Fokal proliferatif glomerülonefrit (IgAN, Lupus nefriti, pauci-immün fokal nekrotizan ve kresentik GN)
 - b) Herediter nefrit (Alport sendromu)
 - c) Membranöz glomerülopati
 - d) Trombotik mikroanjiyopati

2.4. FSGS HISTOPATOLOJİSİ

2.4.1. Glomerüler lezyonlar

Glomerüldeki lezyonlar tutulan bölgeye ve alana göre adlandırılmaktadır.

Fokal: Işık mikroskopunda glomerüllerin %50'sinden azının etkilendiği lezyon,

Segmental: Glomerül yumağının sadece bir bölgesinde lezyon olması;

Global: Glomerül yumağının tümünü içeren lezyon;

Glomerüloskleroz: Segmental veya global kapiller kollaps veya kapiller lümenin kapanması ile birlikte glomerüler hasar varlığı. Bu sklerotik alanlarda ultrafiltrasyon olmadığı kabul edilmektedir (29).

Fokal segmental glomerülosklerozda böbreğin bazı glomerülleri etkilenmekte ve etkilenen glomerüllerde de glomerülün bir bölümünde histolojik lezyon oluşmaktadır. Glomerüloskleroz gelişiminde erken dönemde kortikomedüller bileşkede yer alan, jukstamedüller glomerüller etkilenmektedir.

Segmental lezyonlar glomerül yumağının hiler bölgesi veya periferinde oluşmaktadır. Glomerülün epitel hücrelerinde glomerül bazal membranda kalınlaşma, subendotelyal bölgede hiyalin birikimi, glomerül kapiller lümende kollaps ve iskemi ile karakterize sklerotik lezyon oluşmaktadır. Lezyon genelde bir ya da daha fazla glomerüler lobülü içerir, glomerüler kapillerleri tıkar. Lezyonlar, Bowman kapsülüne yapışık veya kapsül ile ilişkisiz olabilir. Bowman kapsülü ile ilişkisiz lezyonlarda, podositlerde hipertrofi gözlenir. Bowman kapsülüne yapışık lezyonlarda, kollabe olan kapiller yumak ile Bowman bazal membranı arasında yapışıklıklar görülmektedir. Glomerülün geri kalan sklerotik olmayan kısmında ise mezangial proliferasyon ve podosit ayakları çıkıntılarında yapışıklıklar vardır. Skarlanmamış glomerüller normal görünümde olabilir ancak morfometrik çalışmalar glomerüler genişlemenin FSGS tanılı çocuk ve erişkinlerde karakteristik olduğunu göstermiştir (30–33).

2.4.2. İnterstisyum ve tübüller

Lezyonlu glomerül yakınındaki interstisyel alanda tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis görülmektedir. İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulgularının yaygınlığı renal işlev ile korelasyon gösterir. Ayrıca tübül epitel hücrelerinin sitoplazmalarında lipidik görünüm, interstisyel alanda kronik enflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenebilmektedir.

2.4.3. Damar değişiklikleri

Kan damarlarındaki patoloji; genellikle başlangıçta var olan hipertansiyon ile ilişkilidir ve arter/arteriolar nefroskleroz ile bağlantılıdır. Bazen, arterioller ve küçük arterlerde subendotelyel hyalin birikimi görülebilir.

2.4.4. İmmünfloresan mikroskopisi

Segmental skleroz alanlarında, belirgin bir lineer ya da granüler patern olmadan, genelde IgM ve C3 olmak üzere, immunglobulinler ve C3 birikimi görülebilir. Tutulum olmayan glomerüllerde de spesifik olmayan birikimler gözlenebilir.

2.4.5. Elektron mikroskopisi

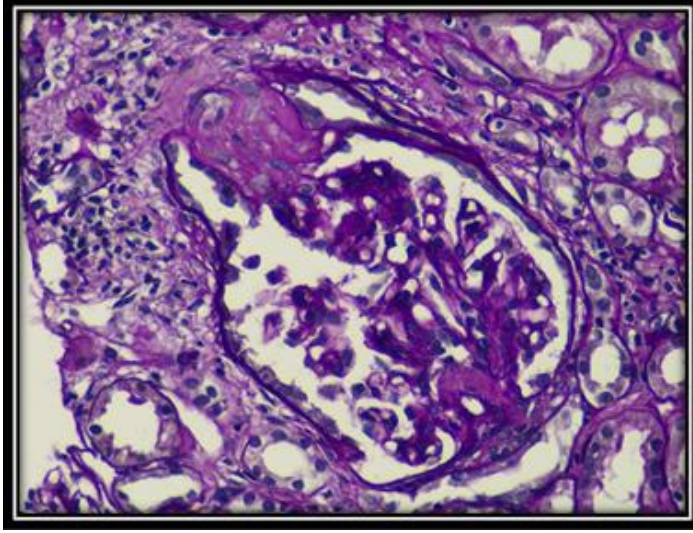
EM’da paramezangial ve subendotelyal granüller, endotel hücrelerde  i me veya silinme, mezangial matrikste artış izlenmekte, depozitlerin ortasında veya endotelyal ve mezangial hücrelerin sitoplazmasında yağ vakuelleri görülebilmektedir. Bowman kapsülü ile bazal membran arasındaki yapı klıklar asellüler materyelin bir araya toplanması ile meydana gelmektedir ve bazal membranları görülür hale getirmektedir.

2.4.6. Morfolojik alt türler

Columbia sınıflamasına göre 5 histolojik alt tip tanımlanmaktadır (1,34). Bu varyantların prognostik önemine dair kesin bir veri olmasa da ve günümüzde etiyolojinin ve moleküler zeminin prognozu belirlediği  ne sürülmekle birlikte, histolojik varyantlarla prognoz arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar vardır (35,36).

1-Tip (glomerüler u ) varyant: Hiler bölgenin karşısında, Bowman kapsülünün tübül başlangıcına komşu kısmında lezyon vardır, lezyon tübüle uzanabilir. İnttrakapiller komponent etkilenen kapillerleri tıkayan köpük hücrelerini, ekstrakapiller komponent geni lemi  ve prolifer  podositlerden oluşur (37). Bazı FSGS-NOS tanılı hastaların erken lezyonlarında tip varyant gözlendiği ve bu hastaların böbrek nakli sonrası tekrarlayan nefrotik sendrom kliniğinde graftta tip varyant FSGS gözlendiği bildirilmektedir (36).

Tanı için çökme varyantı dışlanmalı, perihiler bölgede skleroz olmamalı ve en az bir glomerülde tip lezyonu olmalıdır. Sadece tip lezyonu içeren FSGS, olguların %5-8'ini oluşturur. Steroid tedavisine iyi yanıt verirler, prognozu en iyi gruptur.



Resim 1: Tip varyant FSGS; PAS (X40), (Prof. Dr. Sülen Sarioğlu'nun arşivinden)

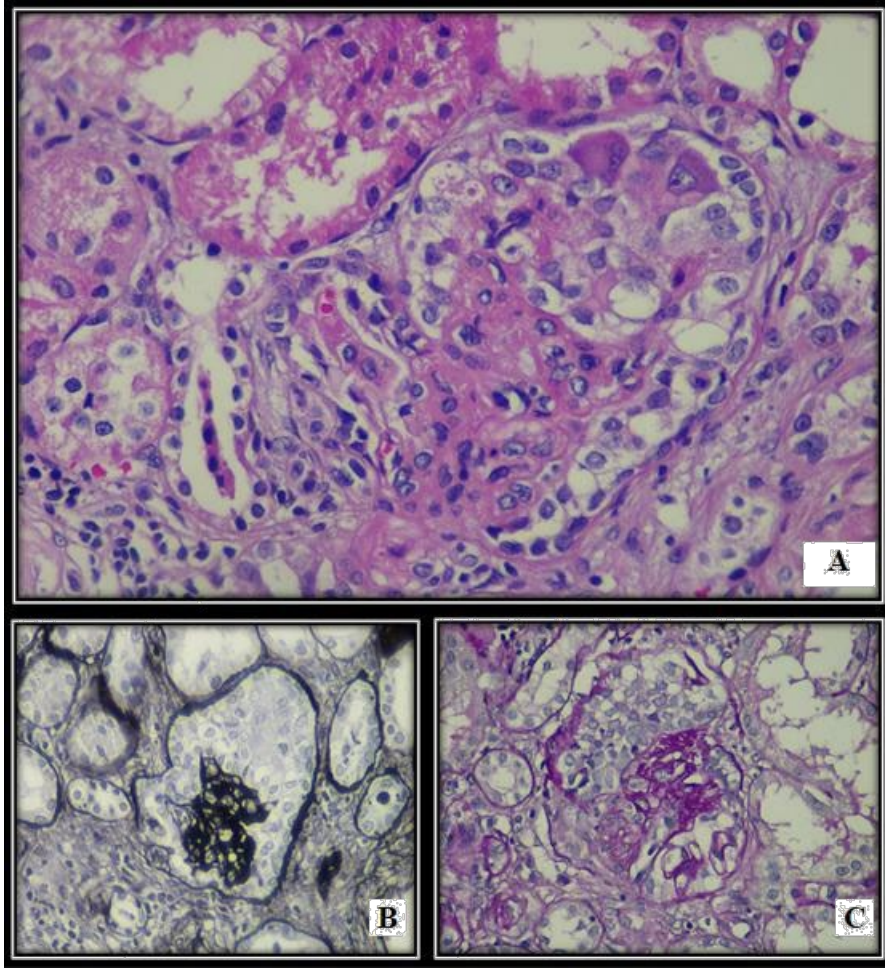
2-Perihiler varyant: Perihiler (vasküler kutup komşuluğunda) lezyonlar yetişkinlerde çocuklara göre; glomerüler hiperfiltrasyon/hipertansiyon, obezite ilişkili glomerülopati, proteinüriye neden olan hipertansif nefroskleroz gibi sekonder nedenlere bağlı olarak daha sık olarak bildirilmektedir. Tanı için en az 1 glomerülde perihiler skleroz, %50'den fazla glomerülde segmental skleroz alanlarının perihiler bölgede bulunması, tip/çökme/sellüler tip lezyonlarının bulunmaması gereklidir. Genelde arterioller hyalinozis de eşlik eder ve bazen perihiler segmentteki hyalinozis ile devamlılık gösterir. Mezengial hiperselülerite beklenmez.

3-FSGS-NOS (Başka şekilde tanımlanmamış): Diğer alt tiplerin dışlanması gerekli olup, FSGS'nin en sık alt tipidir. Skleroze lezyonlar belirgin bir şekilde tanınır ve glomerülün değişik alanlarında izlenir. Segmental glomerüler kapiller lümende tıkanma olabilir ancak podosit hiperplazisi beklenmez.

4- Sellüler varyant: En az bir glomerülde ve glomerüler yumağın en az %25'ini kaplayan, kapiller lümende oklüzyona sebep olan endokapiller proliferasyon varlığı ile tanınır. Endokapiller hücreler tipik olarak köpük hücreleri, makrofajlar ve endotelial hücreleri içerir. Nötrofil ve lenfositler de eşlik edebilir. Endokapiller hücreler bazen apoptoza giderek piknotik

ve karyorektik debris oluşturabilir. Prognozu kötü etkilediğine dair görüşler olsa da, farklı görüşler de mevcuttur (38).

5- Çökme varyantı (kollapsing glomerülopati): Bu varyanta glomerül yumak segmental veya global olarak kollabe olur ve üzerinde podosit hiperplazi ve hipertrofisi izlenir. Kollapsing lezyonlar segmentalden çok global olma eğilimindedir. Erken dönem lezyonlarda mezengial hipersellülerite ve glomerülomegali bulguları beklenmez. Tek bir glomerülde bile kollapsing lezyon görülürse, prognozunun daha kötü olması ve hızla böbrek yetmezliğine ilerleme görülebilmesi nedeniyle, sınıflamanın kollapsing glomerülopati şeklinde yapılması önerilmektedir. Damarlarda spesifik lezyon gözlenmez. Etiyolojisi hala net olarak tanımlanmamış olsa da, viral ajanların sorumlu olduğu düşünölmektedir. HIV ilişkili nefropatide kollapsing glomerülopati bulguları daha sık olarak görülür. Ayrıca kollapsing glomerülopati tanılı hastalarda parvovirüs enfeksiyon sıklığının daha fazla olduğu saptanmıştır. (39–42).



Resim 2: Kollapsing glomerülopati; A: H&E (X40), B: PAMS (X40), C: PAS (X40)
(Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu'nun arşivinden)

2.5. PODOSİT HASARI VE FSGS PATOGENEZİ

Podositler glomerülün visseral epitelyal hücreleri olup glomerül işlevinde rol oynayan pedisel denilen cıkıntılarını ile glomerül bazal membranlarına süzme işlevinde ck önemli destek sağlayan hücrelerdir. 1970'lerin başlarında Karnovsky ve Ainsworth (16) elektron mikroskopi calışmalarında podositlerin yarık diyaframın, glomerüler filtrasyon bariyerinin boyut selektif geçirgenliğini oluşturan en önemli komponenti olduğunu göstermişlerdir. Yetişkin insan böbreğinin her glomerüler yumak bölgesinde yaklaşık 500-600 podosit adet bulunmaktadır (43).

Minimal değişiklik hastalığı, FSGS, MN, DM ve lupus nefriti gibi birçok glomerülonefrit formunda podosit hasarı temel hasarlanma mekanizmasıdır (44,45). Fokal segmental glomerüloskleroz için de hayvan modelleri ve in-vitro calışmalar, kalıtsal

nedenlere de bağılı olabilen, direkt podosit hasarının ana patogenetik faktör olduğunu desteklemektedir (46). Çalışmalar glomerüler hastalıklar için birleştirici hipotez olan “podositopatiler” terminolojisinin doğmasına yol açmıştır (47).

Erken dönemde, altta yatan hastalıklardan bağımsız olarak ve morfolojik saptanabilen değişikliklerden önce, slit diyaframın moleküler düzenleniminde değişiklikler olmaktadır (48).

Başlangıçta olan defekt, podosit miktarının azalması ile podositlerin glomerüler yumakları tamamen çevreleyememesidir. Bunun sonucunda glomerüler yumak ile Bowman kapsülü arasında yapışıklıklar oluşur (49). Yumaktaki kapiller perfüzyon sonucu oluşan infiltrat, yapışıklık bölgelerinde Bowman boşluğu yerine, interstisyuma geçer. Filtrasyonun podositlerin örtmediği kapiller boyunca yanlış yönde olması sonucunda, segmental hasar, tübüler dejenerasyon ve interstisyel fibrozis gelişir (49). Podosit azalmasının/tükenmesinin FSGS ve diğer proteinürik böbrek hastalıklarında başlatıcı olay olduğu, çeşitli glomerüler hastalıklarda izlenen podositüri (idrar sedimentinde podositlerin izlenmesi) ile desteklenmiştir (50,51). Glomerüler endotelial ve mezengial hücreler kolayca proliferere olabilmelerine rağmen, podositlerde azalmaya neden olan bir sorun oluşursa, podositopeniyi kompanse edebilmek için ek ayaksı çıkıntılar oluşturur ve hipertrofiye olurlar. Hafif podosit kaybında, kalan podositler GBM’ı örtmek için hipertrofiye uğrar, ancak progresif azalma ile FSGS ve global skleroz gelişir (52). Wharram ve arkadaşları (52) transgenetik sıçanlarda glomerüler hasar ve podosit sayısındaki azalma ile ilgili 3 evre tanımlamıştır:

Evre 1 (0-%20 podosit kaybı): Mezengial genişleme, geçici proteinüri ve normal böbrek işlevleri

Evre 2 (%21-40 podosit kaybı): Mezengial genişleme, kapsüler yapışıklıklar, FSGS, hafif düzeyde kalıcı proteinüri ve normal böbrek işlevleri.

Evre 3(>%40 podosit kaybı): Segmental-global glomerüloskleroz, kalıcı ağır düzeyde proteinüri ve böbrek işlevlerinde azalma.

Podosit kaybı için in vivo ve in vitro çalışmalar ile yaklaşık bir düzine hücre ölüm mekanizması tanımlanmıştır. Bunlar apoptoz (organogenezde fizyolojik ölüm mekanizması, defektif olması halinde hastalıkların patogeneğinde rol oynar), anoikis (kansere metastazlarında görülen hücre-matriks etkileşimlerinin yokluğu sonucu hücre ölümü), otofaji (açlık ile uyarılan hücre ölümü), entozis (kannibalizm, hücre içinde hücre görülen ölüm şekli), nekroz

(düzenlenmemiş-programsız hücre membran lizisi), nekroptosis (programlı nekroz), mitotik katastrof (MC- aberan mitozla bağılı hücre ölümü) ve diğleridir (53,54).

Farlılaşmış podositlerin mitoz için intrinsik bariyerleri olduğundan, sağlam podositlerde proliferatif cevabın gelişmesi, onları hasardan korumak yerine podosit kaybı ve glomerüler sklerozu artırmaktadır. Çeşitli çalışmalarda, hücre döngüsü düzenleyici proteinlerinin podosit hücrelerince sentezinin artmasının, podosit proliferasyonu için yeterli olmadığını ve başka faktörlere de ihtiyacın olduğunu göstermiştir (55–57).

Yakın zamanda Bowman kapsülünün parietal epitelinde progenitör hücre popülasyonunun olduğu ve visseral podositler için intrarenal progenitör olabildikleri gösterilmiştir (58–60). Bu hücrelerin parietal epitel hücreleri ile podositler arasında karışık bir fenotip gösterdikleri, postnatal ve adolesan farelerin gelişimi sırasında neopodositlere farklılaşıyor olabilecekleri söylenmektedir (61). Parietal epitel hücrelerinin podosit progenitörlerinin temsil edebileceği ve podositlere farklılaşabildikleri keşfedilince, bölünme yeteneği olmayan podositlerde rejenerasyonun nasıl gerçekleşebileceğine dair çalışmalar yapılmıştır.

Parietal epitel hücrelerinin bir kısmı üriner kutupta lokalize olup, yetişkin doku kök hücre belirteçleri olan CD24 ve CD133 birlikte ifade ettiklerinden progenitör hücreler olarak tanımlanmaktadır (62,63). Vasküler kutupta lokalize olan parietal epitel hücreleri ise podosit belirteçlerini ifade etmekte olup (nestin ve podokalsin), CD24/CD133 ekspresyonu göstermezler. Diğ parietal epitel hücreler ise podosit ve progenitör belirteçlerinin ikisini de ifade ederler (64). Glomerülogenez sırasında parietal epitel hücreleri ve podositler ortak mezenkimal progenitörlerden köken almaktadır. Hücre kökeni araştırma çalışmaları, podositlerin, gelişim sırasında Bowman kapsülü boyunca vasküler kutba ve glomerüler yumak üzerine göç eden parietal epitel hücrelerinden gelişebileceğini göstermiştir (65).

Hasar durumlarında parietal epitel hücrelerinin nasıl bir yol izleyeceği ise daha karmaşıktır. Birçok çalışmada glomerüler hasar sonrası sklerotik yumak alanlarında CD44 pozitif parietal epitel hücrelerinin bulunduğunu göstermiştir (66–68). Bu CD44 pozitif aktive hücreler hiperplazi ve hipertrofiye giderek, Bowman kapsülünden glomerüler yumak alanına göç edip, FSGS patogenezinde başlangıç aşamalarında rol almaktadır (67).

Çalışmalar parietal epitel hücrelerinin aktive olması ile birlikte 2 sonuç olabileceğini söylemektedir. Kalıcı CD44 ifadesi ile matriks ve glomerüler skleroza katkıda bulunmak veya tamir sürecinde CD44 ifade kaybı ile birlikte podositlere farklılaşmak. Fare modellerinde ise

parietal epitel hücrelerden podosit oluşumu; normal gelişim aşamasında ve akut glomerüler hasar durumlarında gözlenirken, kronik nefron kaybı durumlarında küçük değişiklikler gözlenmiştir (69,70).

Yakın tarihli bir çalışmada ise parietal epitel hücreleri morfolojilerine göre 3 alt gruba ayrılmıştır: Düz, kuboidal ve intermediate. Kuboidal ve intermediate grup hücrelerin daha kolay aktive olup, sklerotik lezyonların oluşumuna katkıda bulunduğu saptanmış olup, FSGS hastalarına ait biyopsi örneklerinde tip lezyonlarında intermediate gruba ait belirteçlerin ekprese edildiği görülmüştür (71).

Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin, retinoidlerin, steroidlerin podosit progenitörlerinin, podositlere farklılaşabilme kapasitelerini arttırdıklarına dair yayınlar bulunmaktadır (62,72–74). Fokal segmental glomerüloskleroz ve membranöz nefropati oluşturulmuş deneysel hayvan modelinde all-trans-retinoik asitin (ATRA), pariyetal hücrelerin PAX-2 ve WT-1 ifade eden glomerüler geçiş hücrelerine dönüşümünü anlamlı olarak arttırdığını, ayrıca podosit sayısını da arttırdığı gösterilmiştir (73).

Ayrıca Kemokin (C-X-C motif) ligand 12 (SDF-1/CXCL12) blokajının parietal epitel hücrelerinin podosit fenotipi yönüne farklılaşmalarını arttırarak tip 2 diyabetik farelerde podosit sayısını arttırdığı, proteinüriyi azalttığı gösterilmiştir (75,76).

Diyabetik podosit hasarının moleküler patogenezi ile ilgili yapılan birçok araştırma, henüz tam olarak anlaşılmamış birbirleriyle ilişkili birçok yolağın patogeneizde rol oynadığını ve hasarın çok faktörlü olduğunu göstermektedir (77–79). Streptozosin ile sıçanlarda oluşturulan diyabetik nefropati modelinde glomerüllerde glikasyon ürünlerinin arttığı ve hücre dışı matriks artışı, nazal membran kalınlaşması, mezengial genişleme ve fibrozis gibi yapısal değişiklikler gözlenmiştir. Oksidatif strese ek olarak, antioksidan sisteminin azalmış etkinliğinin de diyabet komplikasyonlarına katkıda bulunduğu belirtilmektedir (80). Bu nedenle diyabetik nefropati gelişimini kontrol etmek için antioksidan tedavi seçeneğinin de fayda sağlayabileceğini gösteren çalışmalarda; streptozosin ve 5/6 nefrektomi ile oluşturulan DM ve HT (birlikte ve ayrı ayrı) hayvan modellerinde, antioksidan işlevi bilinen lipoik asit ile tedavi edilen gruplarda Bowman kapsül kalınlığı, glomerüler çap, interstisyel fibrozis, mezengial matriks artışı, renal skar, kan BUN ve kreatinin değerlerinde anlamlı düşme olduğu gözlenmiştir (80).

In vitro olarak podosit kültürü üzerinde adriyamin ile uyarılmış podosit hasarı üzerine, dekstametazonun etkisinin araştırıldığı çalışmada, dekstametazonun nefrin ve tübülün α

ifadelerini arttırma, vasküler endotelyel büyüme faktörü (VEGF) düzeylerini ise azaltma yönünde etki ettiği görülmüştür. Hücre döngüsünde rol alan siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü p21'i baskılayarak, apoptoz üzerine etkisi olmadan podosit sağkalımını arttırdığı, podositlerce üretilen IL-6 ve IL-8 sitokin düzeylerinde anlamlı azalma olduğu görülmüştür (81). İlk oluşan podosit hasarından, FSGS'a ilerlemede parietal epitel hücreleri, endotelyal hücreler, tübül epitel hücreleri arasında gerçekleşen yerel hücrelerel olaylar rol almaktadır (82). Fokal segmental glomerüloskleroz patogeneğinde rol alan diğer faktörler aşağıda verilen başlıklar altında incelenebilir:

2.5.1. Podositlerin genetik hastalıkları

Pek çok podosit ve podosit ilişkili proteinlerdeki mutasyonun steroid tedavisine dirençli nefrotik sendrom ve/veya FSGS gelişiminde önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir. Bunlar; ana olarak slit diyafram yapısını, podositlerin aktin iskeletini ve ayakları çıkıntılarının yapısını düzenleyen proteinleri kodlayan genlerdir (83,84).

Bu mutasyonlardan etkilenen proteinlerden bazıları şunlardır:

Nefrin: NPHS1 genindeki mutasyon ile, mutant genin protein ürünü yarık diyaframda dimerize olamaz ve endoplazmik retikülumda kalır. İntrauterin ağır proteinüri ile seyreden Fin Tipi konjenital nefrotik sendroma neden olur (85).

Podocin: NPHS2 geni tarafından kodlanan proteinde mutasyon sonucu otozomal resesif steroid dirençli nefrotik sendrom gelişmektedir (86).

α -aktinin-4: ACTN4 genindeki mutasyonlar yetişkin başlangıçlı otozomal dominant FSGS etiolojisinde yer almaktadır (87). Mutant ACTN4, F-aktin'e daha güçlü bağlanarak podositlerdeki normal filaman düzenlenimini bozar. Ayrıca mutasyon protein yanlış katlanmasına neden olarak, yanlış katlanan proteinlerin ve ubiquitin-proteasome yoluyla aracılığı ile yıkımına da neden olmaktadır (88).

CD2-İlişkili Protein (CD2AP): Yetişkin başlangıçlı FSGS nedeni olup, çocuklukta nadiren FSGS nedeni olarak rastlanmaktadır.

TRPC6 (Geçici (Transient) reseptör potansiyel katyon kanalı tip-6)) Geni: Mutasyonlarında podositlere kalsiyum akışı artarak podositlerde işlev bozukluğuna ve yetişkin başlangıçlı FSGS'ye yol açar.

2.5.2. Uyum mekanizmaları

Hemodinamik hasar ve glomerüler hipertrofi FSGS patogeneğinde rol alan önemli mekanizmalardandır. Fokal segmental glomerüloskleroza, azalan nefron sayısı ve diğer

hemodinamik streslere sekonder olarak gelişen artmış glomerüler kapiller basıncı ve akış hızı aracılık eder. Artmış duvar gerilimi, podosit ayaksı çıkıntıları ve glomerüler bazal membran arasındaki bağlantıda mekanik zorlanmaya yol açar ve bu da kapillerin lokal genişlemesine ve podosit gerilmesine neden olur. Şiddetli ve uzun süreli gerilim, ilerleyici podosit hücre gövdesi zayıflamasına, psödokist oluşumuna ve glomerüler bazal membrandan ayrışmaya yol açar. Podosit dekolmanının açığa çıkardığı çıplak glomerüler bazal membran parçaları Bowman kapsülü ile yapışıklık oluşturabilir. Bunun sonucunda ise filtratın yanlış yönelmesi, tübüler kutbun tıkanması ve Bowman kapsülünün mikrokistik genişlemesi ortaya çıkar. Bu yapışıklık segmental skleroz lezyonlarının ilerlemesi için nidusu oluşturmaktadır (89).

Glomerüler kapiller hipertansiyonun renal hastalığın ilerleyişindeki rolü böbrek modellerinde gösterilmiştir (90). Glomerüler hipertrofinin de insanlarda FSGS'nin gelişiminde bağımsız olarak rol aldığı düşünülmektedir. Remnant böbrek modelinde hipertrofi ile hemodinamik hasarın etkilerini ayırt etmek için dizayn edilmiş birkaç çalışma glomerüler hipertrofinin, glomerüler sklerozun gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir. Genetik olarak hipertansiyona dirençli fareler kullanılarak glomerüler hipertrofi, hipertansiyonun etkilerinden ayırt edildiğinde hayvanlarda progresif glomerüler hasar ya da nefron kaybı olmadığı görülmüştüğü, ancak artmış glomerüler skleroz görüldüğü saptanmıştır (91).

Obezitede görülen artmış ekskretuar yük de, glomerüler hiperfiltrasyon ve afferent arteriolar dilatasyon gibi adaptif değişikliklere katkıda bulunmaktadır. Ayrıca hiperinsülinemi/insulin direnci de glomerüler hipertrofiye ve renal mezenjiyel hücreler üzerinde patolojik etkilere yol açmaktadır (92). Literatürde tedaviye yanıtı olmayan bir olguda görülen FSGS bulgularının bariatrik cerrahi sonrası gerilediği bildirilmektedir (93).

2.5.3. Sıvısal (Humoral) Etkenler

Fokal segmental skleroz lezyonları immünoglobulinler (özellikle IgM) ve kompleman komponentlerini içerebilir. Ancak benzer birikimlerin immün olmayan aracılı hastalıklarda da (diyabet, hipertansiyon) görülebilmesi bunların glomerüler skarlarda biriken spesifik olmayan immünoglobulinler olduklarını destekler. Kompleman sisteminin yıkım ürünü olan C4d, nefroloji pratiğinde antikor aracılı rejeksiyonu saptamak için sıklıkla kullanılan bir belirteçtir. Günümüzde FSGS patogenizde primer olarak antikorların rol oynadığını destekleyen bir net veri olmamasına rağmen, literatürde primer FSGS'li hastaların böbrek biyopsilerinde saptanan mezengial C4d birikiminin hastalık ilerlemesinde bağımsız bir risk faktörü olduğu belirtilmektedir (94).

Remnant böbreklerde ve diğer glomerüloskleroz modellerindeki çalışmalar sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin glomerüler skar patogenezinde ve renal hastalığın ilerlemesinde rol oynadığını göstermektedir. Podositlerde fibrojenik TGF- β /SMAD sinyal yolağında aktivasyon olduğu ve fibrojenik PDGFR- β ile FGF- β 'nın segmental glomerüler dağılımında ve interstisyumda arttığı gösterilmiştir (95).

2011'de Shimada ve arkadaşları yaptığı çalışmada, podosit hasarının iki aşamalı bir mekanizma ile gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada "İki vuruş (Two hit)" olarak adlandırılan bu immünolojik mekanizmanın ilk aşamasında enfeksiyonlar, allerjenler ve IL-13 gibi T hücre sitokinlerinin uyarısı ile podositte CD80 ekspresyonu artışı olduğu ve bunun podosit hasarına yol açtığı savunulmaktadır. İkinci aşamada ise düzenleyici T hücre (Treg) işlev bozukluğu ile CD80 ekspresyonu durdurulamadığı ve otodüzenlenimin bozulması ile podosit hasarının daha da belirgin hale geldiği belirtilmektedir (96).

2.5.4. Dolaşan-çözünebilir faktörler (Circulating Factor)

Tekrarlayan FSGS hastalarının plazmaferez tedavisine cevap verdiğinin gözlenmesi ve transplantasyon sonrası FSGS'nin en sık ve hızlı tekrarlayan glomerülofrit olması (97), glomerüler bariyerin protein filtrasyonuna etki eden çözünebilir faktörlerin FSGS patogenezinde rol oynuyor olabileceği düşüncesini doğurmuştur. Bu hipotezi kanıtlamak amacı ile in vivo ve in vitro çalışmalar yapılarak, bazı plazma faktörlerinin vasküler geçirgenliği arttırdığı veya proteinüriye neden olabildiği bulunmuştur.

Bu amaçla yapılan araştırmalarda, Savin ve arkadaşları tekrarlayan FSGS hastalarındaki serum/plazma glomerüler geçirgenliğinin, kontrollere oranla arttığı ve bu artışın plazmaferezle azaldığını saptamışlardır (98). Fokal segmental glomerüloskleroz hastalarının plazmalarından izole edilen 30-50 kDa ağırlığında "FSGS faktör" ünün iv vitro çalışmalarda glomerüler albümin geçirgenliğini arttırdığı ve FSGS tanılı hasta plazmalarının zenginleştirilmesi ile elde edilebileceği saptanmıştır. Ek olarak hasta plazmalarında zenginleştirilerek elde edilen bu faktör sıçanlara enjekte edildiğinde, proteinüri geliştiği fark edilmiştir (99). Benzer olarak kollapsing glomerülopati hastalarının serumları sıçanlara enjekte edildiğinde; sıçan böbreklerinde glomerüler genişleme, fokal segmental ve global kollaps, podositlerde şişme ve hipertrofi, ve diffüz olarak ayaksı çıkıntılarda silinme izlenmiş olup; serumlarında "FSGS faktörü" izole edilmiştir (100). Doğduktan 2 ay sonra spontan olarak proteinüri ve FSGS gelişen Buffalo/Mna tip sıçanlar ile yapılan tekrarlayıcı FSGS modelinde; kontrol grubu sıçanlardan, spontan FSGS geliştirebilen sıçanlara nakledilen

böbreklerde proteinüri ve FSGS geliştiği görülmüştür (101). Yakın zamanda “FSGS faktörü” nün çözünebilir ürokinaz tip plazminojen aktivatör reseptör (suPAR), olduğu tanımlanmış ve FSGS tanılı hastaların 2/3’ünde var olduğu gösterilmiştir (99).

Çözünebilir ürokinaz tip plazminojen aktivatör reseptör (suPAR), membran bağlı uPAR’ın yıkımı ve salınması ile oluşarak; uPA, integrin ve vitronektin gibi ligandlara bağlanır. Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, HIV-1, bakteriyel enfeksiyonlar, malarya, çeşitli kanserlerde ile FSGS gibi birçok patolojik durumda arttığı gösterilmiş olup; plazma, kan, beyin omurilik sıvısı, tükürük ve idrarda saptanabilmektedir (102). Fareler ile yapılan çalışmalarda suPAR’ın nativ ve graft böbrek dokularında, podosit $\beta 3$ integrini aktive ederek ayaksı çıkıntıların silinmesine, proteinüriye ve FSGS-benzeri glomerülopatiye neden olduğu gösterilmiştir (99). Transplantasyon öncesi yüksek konsantrasyonlarda saptanan suPAR seviyelerinin, transplantasyon sonrası FSGS tekrarlamaya riskini arttırdığı ve FSGS hastalarında glomerüler filtrasyon hızı (GFR) düşme hızını arttırarak, kronik böbrek yetmezliği gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (99,103).

Total serum suPAR seviyelerinin primer FSGS’de önemli miktarda artış göstermesine rağmen, MDH, MN ve preeklemps gibi diğer glomerülopatilerde artış göstermediği bulunmuştur. Ayrıca literatürde suPAR ve patolojik domainlerinin tespitinin, FSGS risk sınıflaması ve hastalık ilerlemesini belirleyebilmek açısından değerlendirilebileceği belirtilmektedir (104).

2.6. FSGS TEDAVİSİ

Fokal segmental glomerüloskleroz’un düşük görülme sıklığı nedeni ile birçok klinik çalışmada geniş vaka sayılarına ulaşılamamıştır. Ayrıca tedaviye yanıtı sadece morfoloji değil, genetik ve epigenetik faktörler de etkilemektedir (82). Başlangıç tedavisinde nefrotik sendrom kliniği olanlarda kortikosteroid ve bağışıklık baskılayıcı tedaviler tavsiye edilmektedir. Fokal segmental glomerüloskleroz tedavisinde kullanılan bağışıklık baskılayıcı ajanlar kalsinörin inhibitörleri ve mikofenalat mofetil olarak özetlenebilir (105). Glukokortikoidlerin, kalsinörin ve mTOR inhibitörlerinin enflamasyon ve immün baskılayıcı aktivitelerinin; podosit biyoloji ve glomerüler tamir mekanizmaları üzerine rolünün küçük olduğu, bunun yerine bu ajanların podositlerin hücre iskelet stabilizasyonu, hücre matürasyonu ve yaşamı için gerekli sitokin ve sinyal yolları düzenlenmesi ile ilgili etkileri olduğu düşünülmektedir (106).

Tedavinin potansiyel faydaları hastalıkta tam iyileşme, hastalığın kontrol altına alınması ve/veya SDBY'ne gidişte yavaşlamadır. Fokal segmental glomerüloskleroz tedavisinde en sık olarak kullanılan immün düzenleyici ajanlara ek olarak; ödem kontrolü için diüretikler, hiperlipidemi ve proteinüri kontrolü için anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokerleri kullanımı ile yaşam kalitesi ve son dönem böbrek yetmezliğine gidiş hızı yavaşlatılmaya çalışılmaktadır. Tedavide ana hedef proteinüride tam remisyon ve böbrek fonksiyonlarını korumaktır. Ama tüm hastalarda remisyon yapan bir tedavi rejimi ne yazık ki yoktur (105,107).

2.7. FSGS PROGNOZU

Fokal segmental glomerüloskleroz'da prognoz ölçütleri renal olaylar ve proteinürideki değişimler olmak üzere ikiye ayrılabilir. Hastalıkta iyileşme ve hastalığın kontrol altına alınması esas olarak proteinürideki değişikliklerle tanımlanır.

Nefrotik sendromlu primer FSGS'de hastalık seyri oldukça değişkendir. Önemli ön görücü belirleyiciler proteinürinin miktarı, böbrek işlevlerinin derecesi ve tübülointersitisyel hasarın miktarıdır. Nefrotik sendrom ve nefrotik düzeyde proteinüri, serum kreatinin düzeylerinde yükseklik, interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi, kollapsing lezyon varlığı ve steroid tedavisine dirençli proteinüri klinik ve patolojik kötü prognostik bulgular olarak kabul edilmektedir (7,8,108,109). Birçok çalışmada tip varyant FSGS'nin daha iyi prognoza sahip olduğu bildirilmektedir (36). Ayrıca primer FSGS'li hastaların böbrek biyopsilerinde saptanan mezengial C4d birikiminin de hastalık ilerlemesinde bağımsız bir risk faktörü olduğu ve tedavi başarısını düşürdüğü belirtilmektedir (94).

Günümüzde kortikosteroid ve bağışıklık baskılayıcı tedaviye direncin SDBY'nin en güçlü belirleyici bulguları olduğu kabul edilmektedir (4,8,9,110).

Yine yakın zamanlı yapılan araştırmada interstisyel fibrozis derecesinin proteinürik glomerülopatilerde glomerüler filtrasyon hızı (GFR) düşüş riski ile paralellik gösterdiği ve hastalık ilerleme riskini değerlendirmede belirleyici değere sahip olduğu bildirilmektedir (111).

İdiyopatik FSGS olguların çoğunluğunda tam remisyon sağlansa bile nüks oranları %40'lara kadar çıkmaktadır. Hala tedaviye yanıt alınamayan kayda değer hasta grubu bulunmaktadır. Remisyon sağlanamayan hastalarda 5 yıllık renal sağkalım yaklaşık %65, 10 yıllık renal sağkalım ise yaklaşık %30'dur (105,112).

2.7. SKUALEN, SKUALEN KAYNAKLARI VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR

Skualen endojen kolesterol sentezinde yer alan 6 izopren alt ünitesinden oluşan triterpen bileşiği olup, 2 molekül farnezil pirofosfatın NADPH aracılı indirgenme tepkimesi ile yoğunlaşarak oluşur (113).

1916'da Tsujimoto'nun köpek balığı karaciğerinden $C_{30}H_{50}$ formülüne sahip hidrokarbon bileşiğini izole edip, "squalene" ismini verdikten sonra, skualenin farelerde sentezlenebildiği ve fare karaciğerinde de bulunduğu saptanmıştır (114). Skualen; vitamin A, β karoten, koenzim Q10, E vitamini, K vitaminine benzer yapıda olan isoprenoid bileşiğidir. Altı çift bağ içerir, güçlü radikal temizleme kapasitesine sahiptir ve deriyi lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerinden korur (115).

Skualen köpek balığı karaciğeri dışında, doğada buğday tohumu, pirinç kabuğu, zeytinyağı, palm yağında bulunan bir bileşiktir (116). Özellikle sızma zeytinyağı %0,7'lik oranla majör bitkisel skualen kaynağıdır (117). Sızma zeytinyağının skualen içeriği 800-12,000 mg/kg aralığında değişiklik gösterebilmektedir. Sızma zeytinyağı günlük diyetle tek yağ kaynağı olarak kullanılırsa günlük skualen alımı 200 mg'dan fazla olabilmektedir (118).

Skualen emülsiyonları aşılarda adjuvan olarak, kanser ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde koruyucu ve önleyici etkileri nedeniyle, ilaç ve gen taşıyıcısı olarak çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Skualenin, özellikle kanser ve diğer hastalıklardaki koruyucu ve önleyici etkilerine yönelik yapılan araştırmalar, antioksidan ve antitümör etkilerine ilişkin olmak üzere, iki ana konuyu kapsamaktadır. Antioksidan etki, Warleta ve arkadaşlarının (119) araştırmasında ölümsüz insan meme epitelyal hücreleri, minimal invaziv ve yüksek dereceli invaziv meme karsinomu hücre hatları kullanılarak araştırılmıştır. Araştırmada ölümsüz tümöral olmayan insan meme epitel hücre hattında doz bağımlı olarak, intraselüler reaktif oksijen deriveleri (ROS) düzeylerini azalttığı, H_2O_2 ile uyarılan oksidatif hasarı önlediği ve hücreleri DNA hasarına karşı koruduğu bulunmuştur. Diyetle alınan skualenin inflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH) üzerine etkisini araştıran çalışmada akut kolit modeli oluşturulmuş, C57BL/6 fareler ile yapılan çalışmada, skualenin inflamasyon azaltıcı etkileri olduğu gösterilmiştir (120). Kolit için her hayvandan alınan 3 kolonik kesit inflamasyon, yaygınlık ve kript hasarına göre patolog tarafından skorlandırılmış, skualen verilen gruplarda proksimal kolon ve rektumda mikroskobik hasar skoru anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır. 6 hidroksi-dopamin (6-OHDA) ile oluşturulan deneysel Parkinson modelinde;

14 gün boyunca %24'lük protein içeriğine sahip diyetle ek olarak, oral yolla, günde tek doz 0.1 g/ kg dozunda skualen uygulamasının, DA düzeylerini koruduğu ve dopaminerjik nöronal hasarın göstergesi olan DA metabolitlerinin (DOPAC; dihidroksifenilasetik asit) ve HVA (homovalinik asit) düzeyinde striatumda anlamlı bir azalma saptanmıştır (121).

Birçok deneysel modelde skualenin heksaklorbifenil, heksaklorbenzen, arsenik, teofilin, fenobarbital ve striknin gibi çeşitli kimyasal ajanlara karşı detoksifikasyon aktivitesi gösterilmiştir (122,123). Bu potansiyel etkiyi araştırmak için skualenin koruyucu etkisi, kemik iliği ve nöroblastom hücre hattında, sisplatin toksisitesine karşı etkisi bilinen bir hücre koruyucu ajan olan glutatyon (124) ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Koloni faktör ünitesi (CFU) analizinde, skualenin doz bağımlı olarak hematopoetik kolonilerin sayısını arttırdığı görülmüştür (125). Aynı grup tarafından in vitro çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak tasarlanan, in vivo çalışmada da skualenin kemik iliği mikroçevresinde bulunan mezenkimal kök hücrelerinin karakteristik özelliklerine sahip CFU-F (CFU-fibroblast) kolonilerini karboplatin ve sisplatin toksisitesine karşı, ilgili ajanların tümör hücrelerine olan etkinliğini azaltmaksızın koruduğu gözlenmiş, sisplatin tedavisi ile GSH düzeylerinde iki kata varan azalma in vivo çalışmada ile de desteklenmiş ve skualen ile bu etki tersine çevrilmiştir (126).

İsoproterenol ile uyarılan miyokard infarktüsü modelinde isoproterenol uygulaması öncesi skualen kullanımının lipit peroksidasyonunun etkisini tersine çevirdiği ve glutatyon (GSH) düzeyleri ile glutatyon bağımlı antioksidan enzimlerin düzeylerini koruduğu gözlenmiştir (127). Skualenin radyasyon üzerine etkilerini araştıran bir deneysel çalışmada, 14 gün boyunca %2'lik skualen ile beslenen farelerde, skualen uygulamasının daha uzun yaşam süresi için belirleyici faktör olduğu bildirilmektedir (128). Karsinojen aktivasyonun düzenlenmesi, antioksidatif aktiviteleri ve Ras farnesilasyonu inhibisyonu skualenin toksisite önleyici etkilerini açıklayan mekanizmalardandır. (129,130). Yakın zamanda Türkiye kaynaklı yayında farelerde sisplatin ile uyarılan böbrek hasarı modeli oluşturularak skualenin koruyucu etki mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. Skualen kullanımı ile AKT/mTOR sinyal yolağının aktivasyonu yoluyla oksidatif hasarın ve böbrekte histopatolojik hasar bulguların azaldığı gösterilmiştir (131).

2.8. ADRIAMİSİN İLE SIÇANLARDA OLUŞTURULAN FSGS MODELİ

Adriyamisin (ADR, doksurubisin) bir antineoplastik antibiyotik olup, deneysel çalışmalarda sıçanlarda nefropati ve FSGS modeli oluşturmak için kullanılmaktadır. Birçok

çalışmada sıçanlarda nefropati oluşturmak amacıyla değişen sıklık ve dozlarda ADR uygulanmış olup, uygulanan doz ve sıklığa göre semptom, patolojik bulgular ve deney sürelerinde değişiklikler bulunmaktadır (132,133). Çalışmalarda ADR 5, 7.5, 10 veya 15 mg/kg olarak kuyruk veninden tek doz verildikten yaklaşık 2 hafta sonra sıçanlarda proteinüri, hipoalbuminemi, hiperlipidemi, hiperkoagülabilité, ödem oluşmaktadır (134,135). 7,5 mg/kg gün uygulama ile 5-10. günler arasında idrar çıkışında artış izlenmekte olup, oligürü gözlenmemiştir. Histopatolojik olarak da proteinürinin başladığı erken dönemde (1-2. haftalarda) böbrek korteksinde yangısal hücre infiltrasyonu, glomerül ayaksı çıkıntılarda anyonik değişiklikler ve sialik asit kaybı olduğu gösterilmiştir (135). 3. haftadan sonra böbrek işlevlerinde bozulmaya paralel olarak histopatolojik değişiklikler de oluşmaya başlamaktadır ve mezangial yatakta genişleme, interstisyel fibrozis, tübüler atrofi meydana gelmektedir. Glomerüler sklerozun en iyi olduğu dönem 8-12 haftalardır (136). Düşük dozlarda glomerüloskleroz oluşumu daha zor olup, glomerüloskleroz oluşumunu artırmak için ek olarak hiperlipidemi oluşturmak gibi ek yöntemler veya ADR uygulamasının tekrarlanması gerekebilmektedir (136–143). ADR sıçanlarda demir-antrasiklin kompleksi oluşturarak nefropati yapmaktadır. Adriyamisin aktif metaboliti oksijen molekülü ile reaksiyona girerek, demir-antrasiklin kompleksi oluşmakta ve lipid peroksidasyonu ile serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Böylece mikrozom, sitozol, membran lipitleri, mitokondri gibi önemli hücresel alanlarda oksidatif hasar oluşmaktadır (144,145). Deman ve arkadaşları adriyamisin modelinde renal kortekste izledikleri glutatyon düzeylerindeki azalmanın, nefrotoksisitenin serbest radikal oluşumu nedeni ile oluştuğunu desteklediğini savunmaktadır (144). Stenberg ADR uygulaması ile çalışmasında podositlerin ayaksı çıkıntılarının hasarlandığını bildirmektedir (146).

Podositlerde hücre membran hasarı belirgin olup, podosit hasarı ile masif proteinüri oluşmaktadır. Adriyamisin direkt etkisi ve proteinürinin ile tetiklenen hiperlipidemi ile birlikte, böbreklerde glomerüler sklerozise kadar ilerleyen hasarlanma oluşmaktadır. Proteinüri, hiperlipidemi, böbrek işlevlerinde bozulma, ağırlık kaybı kliniği ile giden nefropati meydana gelmektedir. Bertani ve arkadaşları tek doz 5 mg/kg ADR uygulamasından 6 ay sonra fokal segmental skleroz lezyonlarının %50'sine şiddetli tübüler ve interstisyel değişikliklerin eşlik ettiğini bildirmiştir (147).

Düşük doz ADR ile yapılan geçmiş çalışmalarda erken evrede normal morfolojik görünüm, orta evrede glomerüllerde vakuoler değişiklikler, geç evrede ise global/segmental

sklerozlar ile birlikte tübülointerstisyel değişikliklerin izlendiği belirtilmektedir (148). Yüksek doz adriyaminle toksik belirtiler daha belirgin ve yoğun oluşmaktadır (147,149).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyisel çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Sıçanlar Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi. Biyokimyasal incelemeler DEÜ Merkez Biyokimya laboratuvarında, histopatolojik incelemeler DEÜ Tıbbi Patoloji laboratuvarında yapıldı. Çalışmaya başlamadan önce DEÜ Multidisipliner Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'dan (DEÜ-HADYEK) araştırma için onam alındı (Ek 1).

3.1. Sıçanlar ve Bakımları

Wistar Albino cinsi, ağırlıkları 300-350 gr arasında olan toplam 36 adet yetişkin erkek sıçan çalışmaya dahil edildi. Beslenmeleri standart sıçan yemi ile yapıldı ve aldıkları kadar su verildi. 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık siklusunda, 22°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) ısıda ve %55 (± 10) nemli ortamda standart bakımları yapıldı. Deney boyunca bakım kafeslerinde takip edilen sıçanlar 14. ve 22. günlerde 24 saat süreyle metabolik kafeste izlendi, ağırlıkları ile su ve katı gıda alımları ölçüldü ve 24 saatlik idrarları toplandı. Ayrıca sıçanların 48. saat, 72. saat, 96. saat, 1.hafta, 10. gün ve 20. günde ağırlık ve 48. saat, 96. saat, 1.hafta, 10. gün ve 20. günde katı gıda ve su tüketim ölçümleri yapıldı.

3.2. FSGS Modelinin Oluşturulması

Deneyde FSGS modeli antrasiklin antibiyotik grubunda yer alan ve daha önce birçok deneysel çalışmada aynı amaçla kullanılan adriyamisin (doksorubisin) ile oluşturuldu (134). 2 adet sıçan ile yaptığımız pilot çalışmada 10 mg/kg (134) dozunda verdiğimiz adriyamisin ile erken hayvan kaybı gözlemlendiği için, adriyamisin dozu 7,5 mg/kg (135,150) ve deneyin toplam süresi adriyamisin uygulaması sonrası 23 gün olarak belirlendi. Deneyin başlangıcı adriyamisin uygulanan gün baz alınarak 0. gün olarak kabul edildi. Deney süresince yapılan intravenöz enjeksiyonlar, eter anestezisi eşliğinde kuyruk veninden uygulandı.

3.3. Kuyruk veninden adriyamisin enjeksiyonu

Eter anestezisi altındaki sıçanların kuyruğu ılık suyla temizlendi, alkol ile silindi. Ilık su ile vazodilatasyon sağlanarak, 3-5 sn beklendi. Belirginleşen dorsal vene 24 G'luk damar yolu

kanülü, 15-20 derece açı ile girildi. Venin içine girildiğine, iğne ucuna dolan kan ile karar verildi. İlaç yavaş şekilde zerk edildi.

3.4. Skualen formlarının uygulaması

Köpek balığı kaynaklı skualen (SQ-KK) “Sigma Chemicals Company, St. Louis, MO, USA” firmasından, %98 saflıkta, sıvı formda, 10 ml’lik ışık geçirmez cam şişeler halinde 2-8°C saklama koşuluna uygun olarak temin edildi.

Zeytinyağı kaynaklı Skualen (SQ-Z) ise Ekiz Kimya firmasından %96.56 saflıkta, sıvı formda, 10 ml’lik ışık geçirmez cam şişeler halinde, 2-8°C saklama koşuluna uygun olarak temin edildi. Ürünün saflık oranını gösterir kromatografi sonucu ayrıca firma tarafından çalışıldı (Ek: 2)

Literatürde belirtildiği şekilde intraperitonel (İp) yoldan sıçanlara uygulamak üzere; Skualeni çözünür hale getirebilmek için 80 mg skualen (yaklaşık 0.1 ml) % 99.5 ‘luk 0.9 ml etanol içinde çözdürülüp, sonrasında 5mg/ml skualen içeriğine sahip olacak şekilde Intralipid® 200-mg/ml yağ emülsiyonunda çözülerek, skualen dozu 100 mg/kg olacak şekilde İp yoldan sıçanlara uygulandı (126). Ancak ilk uygulanan 4 sıçanda etil alkol intoksikasyonuna bağlı olduğu düşünülen solunum durması ve exitus izlendi. Sonraki tüm skualen uygulamaları literatürde uygulandığı şekliyle; adriyaminin uygulamasından 1 hafta önce başlanarak 14 gün süreyle, her gün oral gavaj yolu ile 0.4 ml/sıçan olacak şekilde yapıldı (151).

3.5. Deney grupları

Deney başlangıcında her grupta 7’şer sıçan olarak planlanan süreç; İp yoldan etil alkol içerisinde çözdürülerek uygulanan SQ ile gözlenen dört adet hayvan kaybı nedeniyle, kontrol grubu 3, diğer gruplar 7’şer hayvandan oluşacak şekilde yeniden planlandı. SQ oral gavaj yolu ile uygulandı.

1) Kontrol grubu (K) (S=3): 3 adet sağlıklı sıçan hiçbir girişimde bulunulmadan 23 gün boyunca izlendi, 23. günde kurban edildi.

2) Adriyaminin (ADR) uygulanan grup (S=7): Deneyin birinci gününde, liyofilize toz halinde, 7,5 mg/kg tek doz adriyaminin (Adriablastina 10mg flakon, Carlo-Erba İlaç Sanayi) 2cc serum fizyolojik içinde çözdürülerek kuyruk veninden sıçanlara enjekte edildi.

3) Köpek balığı kaynaklı (KK) SQ uygulanan grup (S=7): Deney

başlangıcından itibaren 14 gün boyunca, her gün 0.4 ml/sıçan dozunda oral gavaj yoluyla uygulandı. 23. günde sakrifizasyon işlemi gerçekleştirildi.

4) Zeytinyağı kaynaklı (Z) SQ uygulanan grup (S=6): Deney başlangıcından

itibaren 14 gün boyunca, her gün 0.4 ml/sıçan dozunda oral gavaj yoluyla uygulandı. 23. günde sakrifizasyon işlemi gerçekleştirildi. Z-SQ +ADR uygulanan gruptaki hayvanlardan biri adriyaminin uygulaması sırasında kaybedildiğinden bu gruptaki hayvanlardan biri ADR +

5) ADR uygulanan grup + KK- SQ (S=6): SQ-K adriyaminin uygulandığı

günden 1 hafta önce başlayıp, adriyaminin uygulaması sonrası 1 hafta daha devam edecek şekilde, toplam 14 gün boyunca, her gün 0.4 ml/sıçan dozunda oral gavaj yoluyla uygulandı. Bu gruptaki hayvanlardan biri adriyaminin uygulaması sırasında kaybedildi ve 6 adet sıçan ile çalışmaya devam edildi. Adriyaminin uygulamasından itibaren 23. günde sakrifizasyon işlemi gerçekleştirildi

6) ADR + SQ -Z uygulanan grup (S=7): SQ-Z adriyaminin uygulandığı

günden 1 hafta önce başlayıp, adriyaminin uygulaması sonrası 1 hafta daha devam edecek şekilde, toplam 14 gün boyunca, her gün 0.4 ml/sıçan dozunda oral gavaj yoluyla uygulandı. Bu gruptaki hayvanlardan biri adriyaminin uygulaması sırasında kaybedildiğinden sadece SQ-Z grubundaki bir adet sıçan bu gruba dahil edildi. Adriyaminin uygulamasından itibaren 23. günde sakrifizasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.6. Deney Süresince yapılan İncelemeler

- Ağırlık ölçümleri; adriyaminin uygulaması yapılan gruplarda adriyaminin uygulamasını takiben, diğer gruplarda da aynı günlere paralel gelecek şekilde 48. Saat, 72. Saat, 96. Saat, 7. gün, 10. gün, 14. gün, 20. gün ve 23. günde yapıldı.

- Yem-su tüketim takipleri; adriyaminin uygulaması yapılan gruplarda adriyaminin uygulamasını takiben, diğer gruplarda da aynı günlere paralel gelecek şekilde 48. Saat, 96. Saat, 7. gün, 10. gün, 14. gün, 20. gün ve 22. günde yapıldı.

- ADR + SQ uygulanacak gruplara 1 hafta SQ uygulamasının ardından, sadece ADR uygulanacak gruba ise 0. günde adriyaminin kuyruk veninden enjekte edildi.

- 13. gün ve 22. günlerde hayvanlar metabolik kafese alındı. Diğer günlerde sıçanlar yaşam kafeslerinde takip edildi, günlük muayeneleri yapıldı ve davranışları gözlemlendi.

- ADR+SQ-KK uygulanan grupta 3 adet sıçan erken dönemde exitus olduğundan, diğer hayvanları riske atmamak amacıyla 20.günde erken sakrifizasyon yapıldı. Bu nedenle bu grup ikinci defa metabolik ve alınmadı. 22. güne ait 24 saatlik idrarda protein, kreatinin ve üre düzeyleri değerlendirilemedi.

- Metabolik kafeste 24 saat süre ile tutulan hayvanların; 24. saat sonunda her biri tartıldı, 24 saatlik idrar dışkıdan ayrılmış olarak toplandı, sıvı ve katı gıda alımları ile idrar hacimleri ölçüldü.

- Toplanan 24 saatlik idrarlarda protein, kreatinin ve üre düzeyleri aynı gün olmak üzere bakıldı.

- 23. günde derin eter anestezisi altında, batın usulüne uygun şekilde açılıp, biyokimyasal inceleme amacıyla vena cava abdominalisten 5-8 ml kan toplanarak, hipovolemik şok ile sakrifikasyon işlemi yapıldı. ADR+SQ-KK grubundaki 3 hayvan erken dönemde exitus olduğundan, bu 3 hayvanda kan toplama işlemi gerçekleştirilemedi ve kan analizleri yapılamadı.

- Her iki böbrek çıkarılarak, böbreklere hemen kesi atıldı ve %10'luk tamponlu formolin solüsyonuna tespit işlemine alındı. Alınan kanda üre, kreatinin, albümin, total protein ölçütleri aynı gün bakıldı.

- Tıbbi Patoloji laboratuvarında böbreklerin ağırlıkları tartıldı, her iki böbreğin birer kesit yüzü örneklendi.

- Parafin bloklama işleminin ardından, bloklardan 3'er mikronluk kesitler alındı.

- Alınan kesitlere H&E, PAS, PAMS, Masson-Trikrom histokimyasal boyaları ile WT-1 immünohistokimya boyası uygulandı.

3.7. Biyokimyasal incelemeler:

Sıçanların 24 saatlik idrar örnekleri, metabolik kafeste, ışık geçirmez kaplarda toplandıktan ve hacim ölçümleri yapıldıktan sonra DEÜ Merkez Biyokimya Laboratuvarı'na iletildi. Aynı gün içerisinde 24 saatlik idrarda protein düzeyleri benzetonium klorür kullanılarak fotometrik olarak saptandı ve g/24 saat olarak verildi. Sonuçlar; analizör sonucu x 24 saatlik idrar hacmi / 100000 formülü kullanılarak hesaplandı. 24 saatlik idrarda kreatinin düzeyleri kolorimetrik (Jaffe reaksiyonu) yöntem ile saptandı ve g/24 saat olarak verildi. Sonuçlar; analizör sonucu x 24 saatlik idrar hacmi / 100000 formülü kullanılarak hesaplandı. 24 saatlik idrarda üre düzeyleri üreaz kullanılarak fotometrik olarak saptandı ve g/24 saat

olarak verildi. Sonuçlar; analizör sonucu x 2.14 x 24 saatlik idrar hacmi / 100000 formülü kullanılarak hesaplandı.

Sıçanların kan örnekleri, sakrifizasyon sırasında vena cava abdominalisten, sarı kapaklı jelli biyokimya tüplerine, en az 2 ml olacak şekilde toplandı. Aynı gün içerisinde DEÜ Merkez Biyokimya Laboratuvarı'na iletildi. Tüm kan örnekleri DEÜ Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda, BECKMAN COULTER AU5800 otoanalizöründe hazır ticari kitler kullanılarak çalışıldı. Total protein düzeyleri fotometrikbiüret yöntemi ile, albümin düzeyleri bromkrezol yeşili kullanılarak fotometrik yöntem ile, kan üre azotu (BUN) üreaz enzimi kullanılarak fotometrik yöntem ile, kan kreatinin düzeyi kolorimetrik (Jaffe reaksiyonu)-enzimatik yöntem ile saptandı.

3.8. Histokimyasal boyamalar:

3.8.1. PAS (Periodic acid-schiff) Boyama Protokolü:

1. Preparatlar etüvde bekletilerek deparafinize edildi.
2. Çeşme suyu ile durulandı.
3. Periodik Asit Solüsyonu ile 2 dakika okside edildi.
4. Çeşme suyu ile durulandı.
5. Schiff solüsyonu ile 15 dakika inkübe edildi.
6. Ilık musluk suyu altında yıkandı.
7. Harris Hematoksilen ile 1 dakika inkübe edildi
8. Ilık musluk suyu altında yıkandı.
9. %96'lık etil alkol dehidrate edilip, ksilen ile şeffaflandırıldı.
10. Kapatma ortamı (entellan) ve lamelle kapatıldı.

3.8.2. Gümüş metanamin (Silver-methenamine (P.A.S.M)) Boyama Protokolü:

Bio-Optica firmasının 04-043822 kodlu hazır boya kiti kullanılarak uygulama yapıldı.

1. Preparatlar etüvde bekletilerek deparafinize edildi.
2. Çeşme suyu ile durulandı.
3. Periodik asit solüsyonu 10 damla damlatıldı ve 30 dakika beklendi.
4. Çeşme suyu ile yıkandı.
5. İnkübasyon kutusuna alındı.

6. Ayrı bir vialde 10 damla gümüş nitrat, 10 damla hekzametilentetramin, 10 damla sodyum tetraborat solüsyonları karıştırıldı ve preparat üzerine bu karışım uygulanarak, 60 °C’de 30-40 dakika süreyle inkübe edildi.

7. İnkübasyon süresi bitince, preparatta yeterli impregnasyon olup olmadığı kontrol edildi. Eğer yeterliyse 5 dakika beklendi ve distile su ile yıkandı. Eğer impregnasyon zayıf ise tekrar aynı sıcaklıkta inkübe edildi ve 5 dakika aralarla kontrol edildi.

8. 10 damla altın klorid solüsyonu damlatıldı ve 1 dakika beklendi.

9. Distile suda yıkandıktan sonra, yükselen alkol düzeylerinde dehidrate edildi.

10. Ksilen ile şeffaflandırıldı.

11. Kapatma ortamı (entellan) ve lamelle kapatıldı.

3.8.3. Masson-Trikrom (light green) Boyama Protokolü:

Bio-Optica firmasının 04-011802 kodlu hazır boya kiti kullanılarak uygulama yapıldı.

1. Preparatlar etüvde bekletilerek deparafinize edildi.

2. Çeşme suyu ile durulandı.

3. Weigert demir hematoksin 12 damla damlatılıp, 10 dakika beklendi.

4. Yıkama yapmadan, preparattan solüsyonun akışı sağlandı ve 10 damla alkolik pikrik asit damlatılarak 4 dakika beklendi.

5. Hızlıca çeşme suyunda yıkama yapıldı (3-4 saniye).

6. 10 damla Ponceau asit fucsine solüsyonu (Masson) damlatılarak 4 dakika beklendi.

7. Musluk suyu altında yıkandıktan sonra, fosfomolibdik asit solüsyonu 10 damla damlatılarak, 10 dakika beklendi.

8. Yıkama yapmadan, preparattan solüsyonun akışı sağlandı ve 10 damla light green solüsyonu damlatılarak 5 dakika beklendi.

9. Distile suda yıkandıktan sonra, en son aşamadan absolü alkolde (%99) 1 dakika kalacak şekilde, hızlıca yükselen alkol düzeylerinde dehidrate edildi.

10. Ksilen ile şeffaflandırıldı.

11. Kapatma ortamı (entellan) ve lamelle kapatıldı.

3.8.4. Wilms tümör 1 proteini (WT-1) immünohistokimyasal boyaması:

Cell Marque firmasının fare monoklonal antikoru (6F-H2 klonu) kullanıldı.

İmmünohistokimyasal boyama için parafine gömülü dokulardan elektrostatik yüklü lamalara 3 µm kalınlığında kesitler alındı ve etüvde 60°C’de en az iki saat kurutuldu. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere, tüm boyama süreci Ventana,

BenchMark XT tam otomatik immünohistokimya boyama cihazında gerçekleştirildi. Antijen açığa çıkarma işlemi 95°C’de 62 dakika inkübasyon ile yapıldı. Zıt boyama, Hematoksilen ve mavileştirici solüsyon ile cihazda tamamlandı. Kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılmaları ve lamel ile kapatılma aşamaları otomatik olarak yapılarak immünohistokimya boyama protokolü tamamlandı.

3.9 Histopatolojik değerlendirme

Sıçan böbrekleri 24 saat %10’luk tamponlu formolin solüsyonu ile tespit sonrası, her iki böbreğin birer kesit yüzü aynı kasette olacak şekilde işleme alındı. Doku takibi ve parafin bloklama işlemlerinin ardından 3’er mikronluk H&E, PAS, PAMS, Masson Trikrom histokimyasal boyaları ve WT-1 immünohistokimyasal boyası uygulanmak üzere her bloktan toplam 5 adet kesit hazırlandı. Tüm preparatlar ışık mikroskopunda (Nikon, Labophot-2, Japan) değerlendirildi.

3.9.1. Bowman kapsülü ve glomerüler yumak alan ölçümleri:

Kesitler üzerinde, korteks medulla arası, her kesit için toplam 50 adet glomerülde ölçüm yapıldı. Ölçümler; ışık mikroskopuna entegre kamera (Nikon DS-Fi2) ile dijitalize edilerek, kamera ile birlikte sağlanan görüntü analiz programında 40X objektif ile gerçekleştirildi. Bowman kapsül ve glomerüler yumak sınırları manuel olarak çizilerek interaktif alan ölçüm metodu kullanıldı. Ölçüm yapılan alanlardan, en büyük boyuta sahip %25’nin ortalaması alındı (152–155).

3.9.2. Glomerüler segmental skleroz skorlaması:

Glomerüler skleroz kapiller duvar kalınlaşması ve kollapsı ile ilişkili, mezengial matriks materyali artışı olarak tanımlanmaktadır (156,157). Sklerotik lezyonlar Bowman kapsülüne yapışıklık gösterebilir veya göstermeyebilir (157).

Glomerüler segmental skleroz değerlendirmesi ışık mikroskopunda, PAS ve PAMS boyalı kesitlerdeki, superfisyel ve jukstamedüller tüm glomerüller sayılarak yapıldı. Her kesitteki değerlendirmeye alınan glomerül ve değerlendirilemeyen glomerül sayıları kaydedildi.

Buna göre SS skorlaması, her glomerül için semikantitatif olarak, Raij ve arkadaşlarının önerdiği metoda göre yapıldı (158,159).

Bu skorlamaya göre:

0 = Segmental skleroz yok

1 = Glomerüler alanın %25'ini ilgilendiren segmental skleroz
2 = Glomerüler alanın %25-%50'sini ilgilendiren segmental skleroz 3 =
Glomerüler alanın %50-%75'ini ilgilendiren segmental skleroz 4=Glomerüler
alanın %75-%100'ünü ilgilendiren segmental skleroz olarak
değerlendirildi.

Bu skorlamaya göre; her skor saptandığı kadar glomerül sayısı ile çarpılarak, elde edilen puan, toplam kesitte değerlendirmeye alınan glomerül sayısına bölündü. Böylece PAS ve PAMS kesitleri için ayrı ayrı SS skor oranları elde edildi. Ayrıca her denekte değerlendirilen en yüksek SS skoru da verildi.

3.9.3. WT-1 immünhistokimya değerlendirilmesi:

WT-1immünhistokimyası glomerüllerdeki podosit sayısını değerlendirmek üzere uygulandı. Her kesitte , 40'lik büyütmede , rastlantısal olarak en az 30 glomerül sayılarak, her glomerüldeki WT-1 pozitif hücre sayıları toplanıp, elde edilen verinin ortalaması alındı (WT 1 pozitif boyanan hücreler/glomerül sayısı) (160). Ayrıca her böbrek kesiti için, glomerül başına, en yüksek ve en düşük WT-1 pozitif hücre sayıları da kaydedildi.

3.9.4. İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulgularının değerlendirilmesi:

Böbrek parankimin dört bileşeninden ikisini oluşturan interstisyel ve tübüler alanda enflamasyon, hasar ve atrofi bulguları genelde birbirine eşlik etmektedir. İnterstisyel fibrozis, Masson trichrome boyalı kesitlerde normal interstisyel dokuya göre daha solid ve daha koyu boyanan alanlar; atrofik tübüller ise bazal membranları kalınlaşmış normal tübüllere göre daha küçük tübüller veya epitelleri incelmış, bazen kistik olabilecek kadar büyük olabilen normal tübüllere göre daha büyük tübüller olarak tanımlanmaktadır (161). İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi, Masson trichrome boyalı kesitlerde Bertani ve arkadaşlarının önerdiği metoda göre skorlandı (162). Buna göre:

- 0: Değişiklik yok,
- 1: Biyopsinin %25'inden azını etkileyen bulgu
- 2: Biyopsinin %25-50'sini etkileyen bulgu
- 3: Biyopsinin%50'den fazlasını etkileyen bulgular olarak derecelendirildi.

3.9.5. İnterstisyel enflamasyon ve tübüler hasar bulgularının değerlendirilmesi:

İnterstisyel enflamasyon; interstisyumda lenfoplazmositer enflamatuar hücrelerin varlığı ve yaygınlığı belirlenerek değerlendirildi. Tübüler hasarlanmanın ışık mikroskopik morfolojisi; tübül epitel hücrelerinde şişme ve/veya vakuolizasyon, tek hücre nekrozu, tübül epitel hücrelerinin bazal membranlarından ayrılıp lümene dökülmeleri, PAS ile tübül epitel hücrelerinde fırçamsı kenarlarda azalma veya kayıp, tübüllerde dilatasyon, epitelde düzleşme, toplayıcı duktuslarda granüler hiyalen silendir birikimi bulgularının böbrek parankiminin yüzde kaçını etkilediği göz önüne alınarak değerlendirildi.

Her iki ölçüt ayrı ayrı, aynı metot ile skorlandı (163).

0: Parankimin <%10'undan azında interstisyel enflamasyon/tübüler hasar bulguları

1: Parankimin %10- %25 'inde interstisyel enflamasyon/tübüler hasar bulguları

2: Parankimin %25- %50 'sinde interstisyel enflamasyon/ hasar bulguları

3: Parankimin %50'sinden fazla interstisyel enflamasyon/tübüler hasar bulguları

3.9.6. Trombotik mikroanjiopati (TMA) bulgularının değerlendirilmesi:

TMA glomerül, arteriol ve arterlerde görülebilen, trombosit ve fibrin birikiminin olduğu, klinik olarak mikroanjiopatik hemolitik anemi ve trombositopeninin izlendiği ve organ hasarının eşlik ettiği süreçlerdir (164).

TMA birçok nedene bağlı olarak, çok çeşitli bulgular ortaya çıkabilir; ancak glomerüler dolaşımın endotelial hasara duyarlı olması nedeniyle akut böbrek hasarı sık görülen bir özelliğidir (165).

Trombotik trombositopenik Purpura (TTP) ciddi ADAMTS13 eksikliği, Hemolitik Üremik sendrom (HÜS) shiga-toksin üreten Escherichia coli (E. coli) bakterileri nedeni ile oluşurken; atipik HÜS (a HÜS) diğer TMA nedenleri için kullanılan geniş bir tanımlamadır. Atipik HÜS hastalarının önemli bir kısmında kompleman düzenlenim bozukluğu görülmesi nedeniyle, bu alt grup için kompleman aracılı TMA terminolojisinin de kabul edilmesi önerilmiştir (166,167).

TMA'nın ışık mikroskopik morfolojisi, endotelial hasara doku cevabı bulgularını yansıtır. Akut TMA'nın ışık mikroskopik bulguları arasında; glomerüllerde, subendotelial alanlarda ve mezangiumda genelde fragmente eritrositlerin eşlik ettiği fibrin trombüsleri ile eşlik eden mezangiolizis, endotel hücrelerinde şişme, GBM'da kalınlaşma ve kıvrımlaşma, tromboz görülmeyen glomerül segmentlerinde ise kansız görünüm sayılabilir (168). Hemolitik üremik sendrom nedeni, dışındaki sebeplerle oluşan TMA'larda arteriol ve arter

tutulumu daha sık izlenir (169). Akut TMA durumlarında arter ve arteriollerde; mukoid değişikliklerin eşlik ettiği intimal proliferasyon, nekroz, fibrin trombüsleri, tuzak kalmış eritrosit fragmanları izlenebilir. Ciddi vakalarda kortikal nekroz eşlik edebilir (170).

Kronik TMA bulguları; membranoproliferatif benzeri patern görünümüne yol açan GBM duplikasyonu, fokal segmental ve global glomerüloskleroz ve tübülointerstisyel fibrozistir. İntimal proliferasyon ve fibrozis ile arteriol/ interlobüler arterlerin lümenleri daralır ve malign hipertansiyonda görülen ile benzer şekilde soğan zarı görünümü oluşabilir (170).

Klinik olarak akut TMA'da her zaman TTP veya HUS kliniği bulguları izlenir ve altta yatan sebep genelde kesin (toksin, kompleman, von Willebrand faktör, ADAMTS 13 eksikliği gibi) olarak saptanabilir. Kronik TMA'da ise klinik olarak TTP veya HUS bulguları izlenmez ve altta yatan neden kesin olarak saptanamaz (164). Tanımlanan morfolojik bulgulara göre sıçanlara ait böbrek biyopsilerinde TMA bulguları var / yok, var ise akut/kronik ve fokal/yaygın olarak değerlendirilerek kaydedildi.

3.9.7. Vasküler yapılarda tıkalıcı arteriopati bulgularının değerlendirilmesi

Siklosporin toksisitesinde izlenebilen ve arterioller duvar boyunca, vasküler lümeni daraltacak veya tıkalı olacak şekilde PAS pozitif materyal birikimi veya intimada mukoid kalınlaşma olarak tanımlanan lezyonlar; Bertani ve arkadaşlarının önerdiği metod ile şu şekilde derecelendirildi (162) .

- 0: Değişiklik yok
- 1: Hafif düzeyde değişiklik
- 2: Orta düzeyde değişiklik
- 3: Ağır düzeyde değişiklik

3.10. İstatistik

Tüm analizler SPSS paket programı (version 22.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) kullanılarak yapıldı. Deneklerin izlemdeki ağırlıkları, yem ve su tüketimleri, 14 ve 22.günlere ait 24 saatlik idrarda; üre kreatinin, protein düzeyleri, kanda; total protein, albümin, BUN ve kreatinin düzeyleri, böbrek dokularında PAS ve PAMS histokimyasal boyaları glomerüler segmental skleroz skor ortalamaları, en yüksek segmental skor değerleri, tübüler atrofi, interstisyel fibrozis, interstisyel enflamasyon, tübüler hasar bulguları, Bowman kapsüler alan ve glomerüler yumak alan ölçümleri, TMA bulguları, WT-1 immünohistokimyasal

boyanma ortalamaları, en yüksek ve en düşük WT-1 pozitiflik değerleri karşılaştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler için sayı, yüzde, ortalama, standart sapma değerleri verildi. SQ alan ve almayan denekler arasında histopatolojik, biyokimyasal ölçütler ile ağırlık-yem su tüketimleri arasında fark olup olmadığını belirlemek üzere, ölçümle belirtilen değişkenlerin ikiden fazla grup karşılaştırmasında Kruskal Wallis Testi kullanıldı. Grup içi karşılaştırmada Wilcoxon Testi uygulandı. Skorlama ile belirtilen değişkenlerin ikiden fazla grup karşılaştırmasında Ki-kare testi uygulandı. Sayısal değerle belirlenen ölçümsel veriler ile skorlama ile belirlenen verilerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney-U testi ile Kruskal Wallis Testi kullanıldı. Sayısal ölçümler arasında doğrusal veya ters bir ilişki olup olmadığı, varsa bu ilişkinin yönünü ve şiddetinin ne olduğunu belirlemek amacıyla; verilerin normal dağılım göstermemesi nedeniyle Spearman Rank korelasyon analizi kullanıldı. Korelasyon katsayısı (r) nın yorumu, r değeri;

<0.2 ise çok zayıf ilişki ya da korelasyon yok

0.2-0,4 arasında ise zayıf düzeyde korelasyon

0.4-0,6 arasında ise orta düzeyde korelasyon

0.6-0,8 arasında ise yüksek düzeyde korelasyon

0.8> ise çok yüksek düzeyde korelasyon olduğu şeklinde yorumlandı.

Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Sıçanların günlük bakımları sırasında, adriyamisin enjeksiyonundan sonra ikinci haftada genel durumlarında ve beslenmelerinde bozulma, sadece adriyamisin uygulanan grupta ise, ağır kalıcı ishal gözlemlendi. Adriyamisin ile birlikte SQ uygulanan gruplarda ishal bulguları geçici ve hafif olarak gözlemlendi, genel durumları ve hareketlilikleri sadece ADR uygulanan gruba göre daha stabil seyretti. Adriyamisin uyguladığımız süre ve dozlarda, sıçanlarda büyüme geriliğine ve ishale neden olmuştur. Ancak sıçanlara yapılan günlük bakımlarda, ADR uygulanan grupta ishal bulguları daha ağır ve kalıcı olarak gözlenmiş, ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarında ise ishal bulguları daha hafif olarak izlenmiş olup, yaklaşık 2.haftada bu gruplardaki sıçanlarda izlenen ishal bulgularında tamamen düzelme saptanmıştır.

4.1. GRUPLAR ARASINDA VERİLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

4.1.1. Vücut ağırlıkları:

Çalışmamızda deney başlangıcında her altı gruptaki sıçanların ağırlıkları benzerdi (300-350 gr arası). Adriyamisin enjeksiyonu yapılan üç gruptaki deneklerde 48. saatten itibaren deney sonuna kadar ağırlık kayıpları izlendi. Kontrol grubundaki sağlıklı hayvanların ağırlıkları ise deney sonuna kadar artış gösterdi. Köpek balığı ve zeytinyağı kaynaklı SQ uygulanan gruplarda ise 96. saat ölçümlerine kadar ağırlık kaybı, sonrasında ise deney sonuna kadar düzenli ağırlık artışı izlendi.

Tüm gruplardaki sıçanların zaman içinde ortalama ağırlık değişimleri Tablo-4 ve şekil 4'de gösterilmiştir.

0. saat: Grupların başlangıç ağırlıkları arasında fark yoktu.

48. saat: Gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

72. saat: ADR+SQ-Z grubundaki Sıçanların ağırlıkları da kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.003$). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

96. saat: ADR+SQ-Z ve ADR+ SQ-KK gruplarındaki sıçanların ağırlıkları, kontrol grubundaki sıçanlara göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p=0.005$ ve $p=0.018$). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

7. gün: ADR+ SQ-KK grubundaki sıçanların ağırlıkları, kontrol grubundaki sıçanlara göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p=0.009$). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

10. gün: ADR grubundaki sıçanların ağırlıkları SQ-KK ($p=0.026$) ve kontrol ($p=0.007$) grubundaki sıçanlara göre anlamlı düzeyde düşük saptandı. Ayrıca ADR+SQ-Z ve ADR-SQ-KK grubundaki sıçanların ağırlıklarında, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüklük saptandı ($p=0.029$ ve $p=0.044$). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

14. gün: ADR grubundaki sıçanların ağırlıkları SQ-KK ($p=0.012$) ve kontrol ($p=0.004$) grubundaki sıçanlara göre anlamlı düzeyde düşük saptandı. Ayrıca ADR+SQ-Z grubundaki sıçanların ağırlıklarında, SQ-KK ve kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde düşüklük saptandı ($p=0.022$ ve $p=0.007$). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

20. gün: ADR grubundaki sıçanların ağırlıkları SQ-Z ($p=0.039$), SQ-KK ($p=0.01$) ve kontrol ($p=0.003$) grubundaki sıçanların ağırlıklarına göre anlamlı düzeyde düşük saptandı. Ayrıca ADR+SQ-Z grubundaki sıçanların ağırlıkları da kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.022$). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

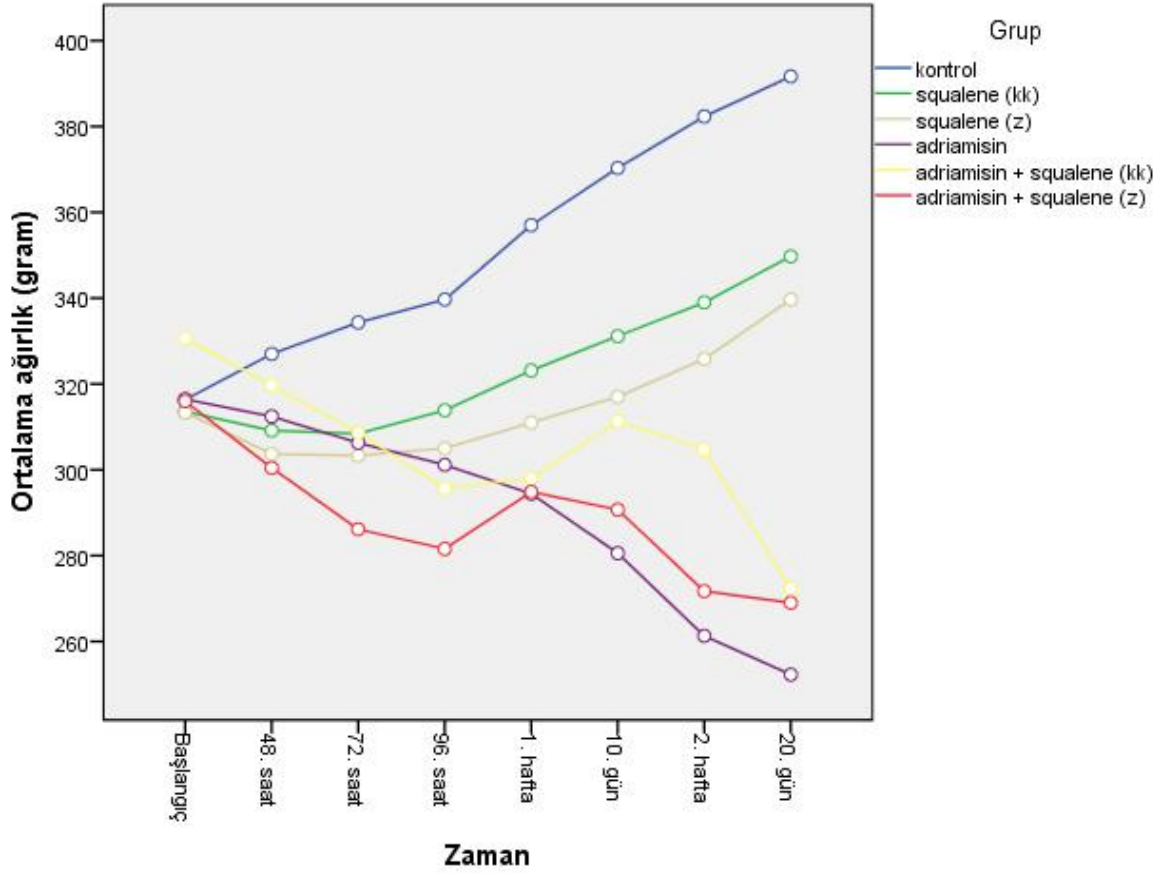
22. gün: ADR grubundaki sıçanların ağırlıkları SQ-KK ($p=0.01$) ve kontrol ($p=0.003$) grubundaki sıçanların ağırlıklarına göre anlamlı düzeyde düşük saptandı. Ayrıca ADR+SQ-Z grubundaki sıçanların ağırlıkları da kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.018$). ADR+SQ-KK grubundaki sıçanlar erken kayıplar nedeniyle erken sakrifiye edildiklerinden bu grubun 22. güne ait verileri bulunmamaktadır. Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

İlk ve son ağırlıklar arasındaki farkın gruplar arası ilişkisi: Adriyaminin grubundaki sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark; SQ-Z, SQ-KK ve kontrol gruplarının ilk ve son ağırlıkları arasındaki farka göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.047$, $p=0.004$ ve $p=0.006$). Ayrıca ADR+SQ-Z ve ADR+SQ-KK gruplarının ağırlıkları arasındaki fark, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.048$ ve $p=0.026$). Adriyaminin ile birlikte uygulanan köpek balığı ve zeytinyağı kaynaklı SQ gruplarında son ağırlık değerleri, sadece ADR uygulanan gruba göre daha fazla olsa da bu ajanların adriyamininin yaptığı büyüme geriliği ve ağırlık kaybına istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi görülmemiştir.

Tablo 4: Sıçanların zaman içinde ağırlık değişimleri

Grup	0.saat (gr)	48. saat (gr)	72. saat (gr)	96. saat (gr)	7.gün (gr)	10.gün (gr)	14. gün (gr)	20.gün (gr)	22. gün (gr)
Kontrol	316 ±10.3	327±5. 57	334 ±5.03	340±7. 09	357 ±4.36	370 ±5.86	382 ± 4.62	392±9. 29	398± 9.64
SQ-KK	314 ± 7.85	309 ± 6.82	308 ± 11.6	314 ± 13.6	323 ± 19.4	331 ± 19.6	339 ± 23.6	350 ± 19.7	366± 19.3
SQ-Z	313 ± 10.7	304 ± 20.1	303 ± 18.5	305 ± 17.6	311 ± 18.3	317 ± 15.4	326± 14.7	340 ± 16.6	356 ± 17.9
ADR	318± 15.7	312± 15	306 ± 18,6	301 ± 19.8	294 ± 25.3	281± 24.3	261± 36.9	252 ± 33.7	245± 35.3
ADR+SQ-KK	331 ± 6.4	322 ± 7.94	303 ± 9.14	286± 14.7	285 ± 18.1	291 ± 24.5	292± 20.4	272 ± 30.9	-
ADR+SQ-Z	316± 8.91	300 ± 8.92	286± 8.61	282 ± 9.36	295± 9.48	291± 11.4	272 ± 15.5	269±2 1.2	274± 31.7

Şekil 4: Zaman İçinde Grupların Ortalama Ağırlıklarındaki Değişim



4.1.2. Yem tüketimleri

Tüm gruplardaki sıçanların 24 saatlik yem tüketim miktarlarının zaman içindeki değişimi Tablo-5’de özetlenmiştir.

48. saat yem tüketimleri: ADR+SQ-KK grubundaki sıçanların yem tüketimi; kontrol ($p=0.038$), SQ-Z ($p=0.002$) ve ADR+SQ-Z ($p=0.049$) gruplarındaki sıçanlara göre anlamlı düzeyde düşük saptandı. Ayrıca ADR grubuna ait sıçanların yem tüketimlerinde, SQ-Z grubuna ait sıçanlara göre anlamlı düzeyde düşüklük saptandı ($p=0.004$). Diğer grupların arasında anlamlı fark saptanmadı.

96. saat yem tüketimleri: ADR+SQ-Z grubundaki sıçanların yem tüketimi; kontrol ($p=0.012$), SQ-KK ($p=0.000$) ve SQ-Z ($p=0.013$) grubundaki sıçanlara göre anlamlı düzeyde düşük saptandı. Diğer grupların arasında anlamlı fark saptanmadı.

7. gün yem tüketimleri: ADR+SQ-KK ve ADR gruplarındaki sıçanların yem tüketimi, SQ-KK grubundaki sıçanlara göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.004$ ve $p=0.045$).

Diğer grupların arasında anlamlı fark saptanmadı.

10. gün yem tüketimleri: ADR, ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarındaki sıçanların yem tüketimi, SQ-Z grubundaki sıçanlara göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.008$, $p=0.012$ ve $p=0.048$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

14. gün yem tüketimleri: Gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı. ADR grubuna ait sıçanların yem tüketimleri, kontrol ve SQ-Z grubundaki sıçanlara göre oldukça azalmış olmasına rağmen gruplar arasındaki farklılık anlamlı saptanmadı ($p=0.076$ ve $p=0.16$).

22. gün yem tüketimleri: ADR+SQ-KK grubundaki sıçanların yem tüketimi, ADR+SQ-Z grubundaki sıçanlara göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.044$). Diğer grupların arasında anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 5: Sıçanların 24 saatlik yem tüketim miktarlarının zaman içindeki değişimi

Grup	48. saat (gr)	96. saat (gr)	7.gün (gr)	10. gün (gr)	14.gün (gr)	22. gün (gr)
Kontrol	33.0 ±1	28.7± 3.6	27.0±4	27.7±2. 8	27.7±0. 57	20.0 ± 5.57
SQ-KK	30.0 ± 2.24	28.1± 3.08	31.0 ± 3.11	27.6± 2.7	25.0± 4.12	22.1± 3.39
SQ-Z	33.7 ± 3.08	25.8 ± 2.40	28.5 ± 0.54	30.0 ± 1.10	26.9 ± 4.9	24.0 ± 6
ADR	18.9 ± 2.12	16.4 ± 6.68	16.1 ± 8.55	14.0 ± 8.49	13.3 ± 9.34	14.0 ± 8.47
ADR+SQ-KK*	18.0 ± 0.63	15.0 ± 1.67	11.8 ± 1.47	13.3 ± 1.86	15.0 ± 3.74	*12.2 ± 1.64
ADR+SQ-Z	30.6 ± 4.24	11.0 ± 1.87	26.1 ± 7.63	14.7 ± 1.6	19.7±7. 15	24.0 ± 5.39

*Bu gruba ait 3 adet sıçanın, 20. gündeki ortalama günlük yem tüketim verisi verilmiştir.

4.1.3. Su tüketimleri

Tüm gruplardaki sıçanların 24 saatlik su tüketim miktarlarının zaman içindeki değişimi Tablo-6’da özetlenmiştir.

48. saat su tüketimleri: ADR grubunun su tüketimi, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.02$ ve $p=0.004$) Ayrıca ADR+SQ-KK grubunun su tüketiminin SQ-KK grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı ($p=0.037$). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

96. saat su tüketimleri: ADR+SQ-Z grubunun su tüketimi; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.004$, $p=0.02$ ve $p=0.000$). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

7. gün su tüketimleri: ADR grubuna ait sıçanların su tüketimi SQ-Z grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.027$). ADR+SQ-KK grubunun su tüketimi; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.045$, $p=0.008$ ve $p=0.026$). ADR+SQ-Z grubunun su tüketimi de SQ-Z grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.029$). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

10. gün su tüketimleri: ADR+SQ-Z grubunun su tüketimi; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.025$, $p=0.002$ ve $p=0.000$). ADR+SQ-KK grubunun su tüketimi de SQ-KK grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.021$). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

14. gün su tüketimleri: ADR, ADR +SQ-KK ve SQ-Z gruplarına ait sıçanların su tüketimlerinde, SQ-KK grubuna göre anlamlı düzeyde düşüklük saptandı ($p=0.04$, $p=0.001$ ve $p=0.026$). Diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı.

22. gün su tüketimleri: Gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 6: Sıçanların 24 saatlik su tüketim miktarlarının zaman içindeki değişimi

Grup	48. saat (ml)	96. saat (ml)	7.gün(ml)	10. gün (ml)	14.gün (ml)	22. gün (ml)
Kontrol	65.0 ±5	62.0 ± 5.29	68.3 ± 9.07	67.3 ± 20.5	58.3 ± 2.89	43.3 ± 5.77
SQ-KK	68.1 ±2.61	61.1 ± 5.96	65.7 ± 5.35	68.0 ± 4.28	70.7 ± 6.73	41.4 ± 6.9

SQ-Z	69.2 ±10.2	46.5 ± 14.8	67.0 ± 0	63.5 ± 3.83	41.7 ±37.5 ± 7.58	4.08
ADR	40.6 ±3.91	34.3 ± 8.06	37.1 ± 11.4	41.0 ± 9.13	46.1 ± 13.7	47.1 ± 17
ADR+SQ-KK*	43.3 ±2.58	38.3 ± 5.24	33.7 ± 6.71	33.5 ± 6.92	37.0 ±*32.4 ± 11.5	13.1
ADR+SQ-Z	49.0 ±16.4	21.4 ± 2.44	38.4 ± 5.08	21.3 ± 1.6	50.7 ± 13	40.7 ±11

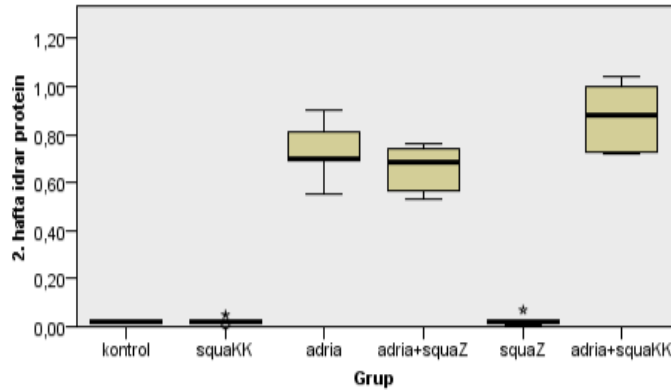
*Bu grupta 3 adet sıçana ait 20. gündeki ortalama günlük su tüketim verisi verilmiştir.

4.1.4. 14.gün idrar hacimleri ve idrar ölçütleri

İdrar hacimleri: Gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

24 saatlik idrar protein: ADR+ SQ-KK grubuna ait sıçanların değerleri; kontrol, SQ-KK ve SQ-Z gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p=0.042$, $p=0.001$ ve $p=0.003$), ADR grubuna ait idrar protein düzeyleri de yüksek bulunmasına rağmen kontrol, SQ-Z ve SQ-KK grupları ile arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.052$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Şekil 5).

Şekil 5: Grupların 14. gün idrar proteinüri ortalama değerleri



24 saatlik idrar kreatinin: Gruplar arasında fark saptanmadı

24 saatlik idrar üre: ADR+SQ-Z grubuna ait sıçanların değerleri; kontrol ve SQ-Z gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.047$ ve $p=0.037$). ADR ve ADR+SQ-KK gruplarında da idrarda üre atılımının da diğer gruplara göre düşük olduğu dikkat çekmesine rağmen, bu gruplarda anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı.

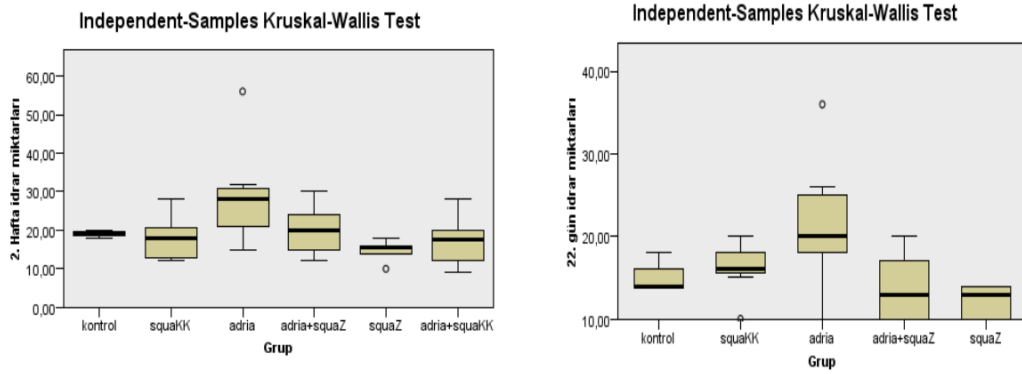
Tablo 7: Gruplardaki sıçanların 14. gün idrar hacimleri ve 24 saatlik idrar ölçütleri

Grup	İdrar hacmi (ml)	24 saatlik idrar protein (g/24 saat)	24 saatlik idrar kreatinin (g/24 saat)	24 saatlik idrar üre (g/24 saat)
Kontrol	19±1	0.0233 ±0.005	0.01± 0.00	1.05 ± 0.63
SQ-KK	17.9± 5.84	0.0243 ± 0.01	0.00933 ±0.001	0.99±0.44
SQ-Z	14.8±2.71	0.0283 ±0.02	0.0107 ±0.002	0.945±0.16
ADR	29±13.4	0.725 ±0.11	0.00743 ±0.001	0.494 ±0.14
ADR+SQ-KK	17.3 ±6.62	0.877 ±0.14	0.008±0.001	0.482 ±0.09
ADR+SQ-Z	20±6.73	0.662 ±0.090	0.00786 ±.001	0.44±0.19

4.1.5. 22. gün idrar hacimleri ve idrar ölçütleri

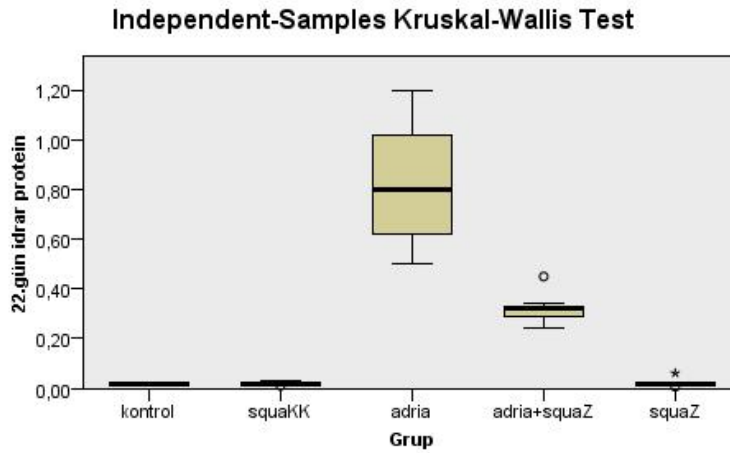
İdrar hacimleri: ADR grubunda, diğer gruplara göre idrar miktarında artış dikkati çekse de gruplar ile arasında anlamlı düzeyde farklılık saptanmadı (Şekil 6). ADR+SQ-KK grubundaki sıçanlarda erken kayıplar görüldüğünden bu gruptan idrar örnekleri elde edilemedi.

Şekil 6: Grupların 14 ve 22. gün idrar hacim ortalamaları



24 saatlik idrar protein: ADR grubuna ait sıçanların değerlerinde; kontrol, SQ-KK ve SQ-Z gruplarına göre anlamlı düzeyde yükseklik saptandı ($p=0.016$, $p=0.001$ ve $p=0.002$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Şekil 7).

Şekil 7: Grupların 22. gün idrar proteinüri değerleri



24 saatlik idrar kreatinin: Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

24 saatlik idrar üre: ADR ve ADR+SQ-Z gruplarına ait değerler; SQ-KK grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.001$ ve $p=0.008$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 8: Gruplardaki sıçanların 22.gün idrar hacimleri ve 24 saatlik idrar ölçütleri ortalamaları

Grup	İdrar hacmi (ml)	24 saatlik idrar protein (g/24 saat)	24 saatlik idrar kreatinin (g/24 saat)	24 saatlik idrar üre (g/24 saat)
Kontrol	15.3 ±2.31	0.0200 ±0.00	0.0100 ±0.00	0.830 ±0.17
SQ-KK	16.1 ±3.18	0.0214 ±0.006	0.0100 ±0.00	1.01 ±0.2
SQ-Z	12.3 ±1.97	0.0255 ±0.01	0.00900 ±0.001	0.767±0.105
ADR	21.7 ±8.20	0.824 ±0.26	0.015 ±0.00	0.37±0.138
ADR+SQ-KK	-	-	-	-
ADR+SQ-Z	13.9 ±4.18	0.321 ±0.060	0.00529±0.00	0.416 ±0.163

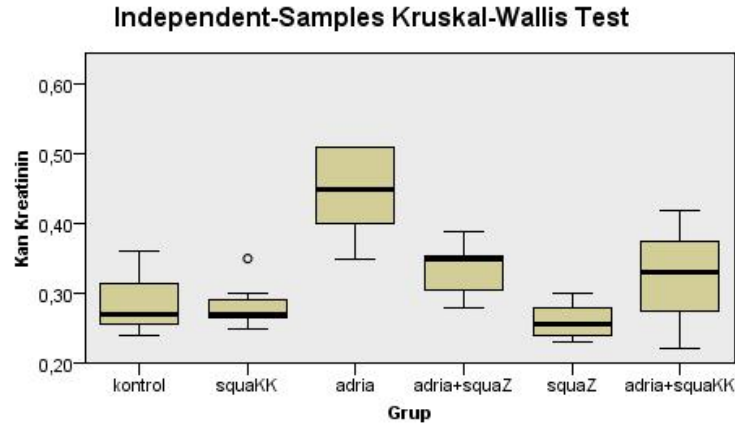
2

4.1.6.Kan analizleri

BUN: ADR, ADR+SQ-Z ve ADR+SQ-KK gruplarının BUN değerleri; kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı (p= 0.022, p= 0.019 ve p=0.011). ADR, ADR+SQ-Z ve ADR+SQ-KK gruplarının BUN değerleri; SQ-KK grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı (p= 0.024, p= 0.020 ve p=0.014). Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Kreatinin: ADR grubundaki sıçanların değerleri SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p=0.002 ve p=0.014). Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Şekil 8)

Şekil 8: Grupların kan kreatinin değerleri



Total protein: ADR grubundaki sıçanların değerleri; kontrol ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.044$ ve $p=0.007$). Ayrıca ADR+SQ-KK grubundaki sıçanların değerleri de kontrol ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p=0.031$ ve $p=0.01$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Albümin: ADR, ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarındaki sıçanların değerleri; kontrol ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük saptandı (ADR $p_1=0.045$, $p_2=0.044$; ADR+SQ-KK $p_1=0.004$, $p_2=0.004$; ADR+SQ-Z $p_1=0.02$, $p_2=0.016$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 9: Gruplardaki sıçanların kan analiz sonuçları

Grup	BUN (mg/ dl)	Kreatinin (mg/ dl)	Total protein (g/ dl)	Albümin (g/dl)
Kontrol	16.8 ±1.15	0.290 ±0.06	6.15 ±0.31	3.17 ±0.01
SQ-KK	17.1 ±1.96	0.283 ±0.03	6.04 ±0.22	3.08 ±0.07
SQ-Z	19.0 ±4.31	0.260 ±0.02	5.86 ±0.15	2.93 ±0.1
ADR	34.9 ±11.8	0.447 ±0.06	4.61 ±0.29	1.43 ±0.08
ADR+SQ-KK	71.9 ±53	0.323 ±0.1	3.77 ±0.98	1.06 ±0.29
ADR+SQ-Z	35.4 ±10.5	0.334 ±0.03	4.76 ±0.27	1.40 ±0.1

4.1.7.Böbrek ağırlıkları toplamı

Gruplar arasında, sakrifikasyon sonrası ölçülen toplam böbrek ağırlıklarının ortalamaları arasında anlamlı fark saptanmadı.

Grupların böbrek ağırlıkları ortalamalarına ilişkin veriler tablo 10 ‘da verilmiştir.

Tablo 10: Grupların böbrek ağırlıkları ortalamaları

Grup	Böbrek ağırlıkları (gr)
Kontrol	4.86 ± 0.61
SQ-KK	4.82 ±0.40
SQ-Z	5.13 ±0.37
ADR	4.51 ±0.73
ADR+SQ-KK	4.53 ± 1.00
ADR+SQ-Z	5.11 ± 0.55

4.1.8. Histopatolojik Bulgular

ADR grubundaki sıçanların böbreklerinin kontrol grubuna göre daha soluk ve daha küçük boyutta oldukları gözlemlendi. Böbrek dokusunun histopatolojik değerlendirmelerinde elde edilen veriler Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11: Gruplara göre histopatolojik değerlendirme sonuçları

Grup	Glomer ülort.B owman alanı	Glomer ülort.Y umak alanı	PAS SS oranı	PAMS SS oranı	TMA bulgul arı	WT -1 ora nı	İnt. fibr ozis	Tüb üler atro fi	İnt. enfl ama syon	Tübül er hasar bulgul arı	Dama r değiş iklikle ri
K1	17357	11323	0.002	0	Yok	11.2 3	0	0	0	0	0
K2	15059	11556	0.003	0.001	Yok	11.4 0	0	0	0	0	0
K3	14938	10971	0.002	0.002	Yok	11.3 5	0	0	0	0	0

SQ-KK1	15539	11333	0.003	0.001	Yok	11.4 4	0	0	0	0	0
SQ-KK2	16970	11805	0.005	0.005	Yok	11.5 6	0	0	0	0	0
SQ-KK3	15712	11058	0.001	0.001	Yok	11.3 7	0	0	0	0	0
SQ-KK4	16126	10940	0.003	0.001	Yok	11.6 1	0	0	0	0	0
SQ-KK5	17270	11859	0	0	Yok	11.2 9	0	0	0	0	0
SQ-KK6	16100	11559	0	0	Yok	11.5 9	0	0	0	0	0
SQ-KK7	16819	11436	0.003	0.001	Yok	11.7 1	0	0	0	0	0
SQ-Z1	17382	12496	0.005	0.005	Yok	12.8	0	0	0	0	0
SQ-Z2	16258	11347	0.007	0.004	Yok	15.5	0	0	0	0	0
SQ-Z3	13720	9689	0	0.006	Yok	13.4	0	0	0	0	0
SQ-Z4	14664	9740	0	0	Yok	14.1 5	0	0	0	0	0
SQ-Z5	17630	11930	0.007	0.007	Yok	16.8 6	0	0	0	0	0
SQ-Z6	14449	9894	0.004	0.002	Yok	15.5 8	0	0	0	0	0
ADR1	10428	7113	0.34	0.29	Yok	8.09	1	1	1	2	0
ADR2	8923	5596	0.38	0.37	Yok	7.75	1	1	1	2	0
ADR3	10381	7223	0.35	0.28	Yok	6.06	1	0	2	2	0

ADR4	8711	5003	0.39	0.39	Yok	7.04	1	1	1	2	0
ADR5	11334	7164	0.24	0.29	Yok	7.04	1	0	2	3	0
ADR6	11585	7834	0.17	0.16	Yok	7.06	1	0	2	2	0
ADR7	10852	7693	0.20	0.21	Var, fokal	7.05	0	1	2	2	0
ADR+SQ -KK1	18696	9647	0.04	0.06	Var, yaygın	9.47	0	0	0	0	0
ADR+SQ -KK2	13776	9443	0.09	0.11	Var, yaygın	8.82	0	0	0	1	0
ADR+SQ -KK3	17968	9880	0.09	0.08	Yok	14.6 8	0	0	1	2	0
ADR+SQ -KK4	14692	9186	0.26	0.21	Yok	7.45	0	0	0	1	0
ADR+SQ -KK5	12349	7847	0.08	0.04	Var, fokal	8.95	0	0	1	2	0
ADR+SQ -KK6	15119	8653	0.13	0.12	Yok	10.6	1	0	1	2	0
ADR+SQ -Z1	14077	8696	0.14	0.11	Yok	10.5 3	1	0	1	1	0
ADR+SQ -Z2	11290	7237	0.12	0.11	Yok	10.6	0	1	0	1	0
ADR+SQ -Z3	14365	9497	0.08	0.10	Yok	13.1 6	0	0	1	1	0
ADR+SQ -Z4	13938	9103	0.13	0.08	Yok	14.6	0	0	0	1	0
ADR+SQ -Z5	13660	8089	0.09	0.10	Yok	11.8 6	0	0	0	1	0

ADR+SQ -Z6	11057	7760	0.10	0.12	Yok	11.5 7	1	0	1	2	0
ADR+SQ -Z7	15383	9235	0.07	0.09	Yok	10.9	0	0	0	1	0

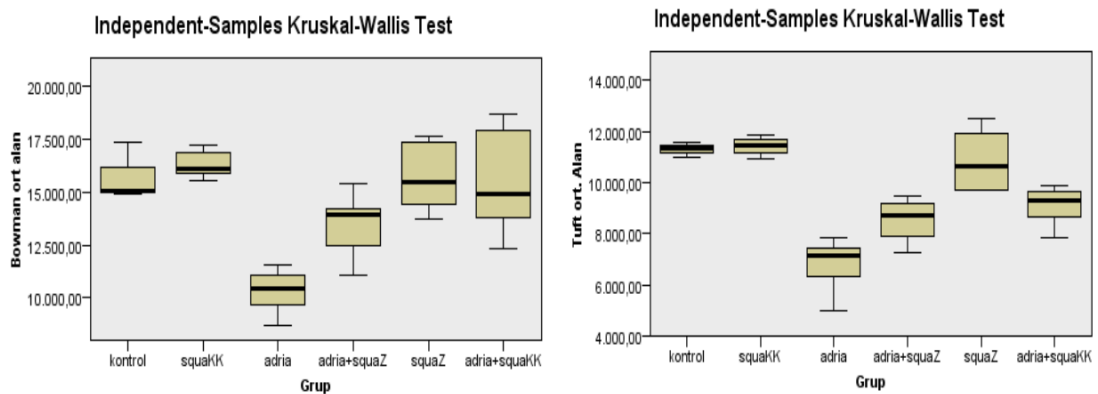
4.1.8.1. Grupların ortalama Bowman ve glomerüler yumak alanları:

ADR grubunun ortalama glomerüler Bowman alanları; SQ-Z, SQ-KK ve ADR+SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde daha düşük saptandı ($p=0.017$, $p=0.001$ ve $p=0.033$). Kontrol grubuna ait ortalama Bowman alanları ADR grubuna göre belirgin yüksek olmasına rağmen, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. Ayrıca ADR+SQ-Z grubunun ortalama Bowman alanları, ADR grubuna göre daha yüksek, kontrol ve SQ-Z gruplarına göre daha düşük olmakla birlikte, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı.

ADR grubunun ortalama glomerüler yumak alanları; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde daha düşük saptandı ($p=0.021$, $p=0.001$ ve $p<0.0001$). Ayrıca SQ-KK grubunun ortalama glomerüler yumak alanları, ADR+SQ-Z grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı ($p=0.032$).

ADR+SQ-Z ve ADR+SQ-KK gruplarının glomerüler yumak alanları, kontrol grubuna göre daha düşük, ADR grubuna göre ise daha yüksek bulundu. Ancak bu gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı (Şekil 9). Grupların glomerüler Bowman ve yumak alanlarına ilişkin ortalama ve standart sapma verileri tablo 11’de verilmiştir.

Şekil 9: Grupların Bowman ve glomerüler yumak alan ortalamaları

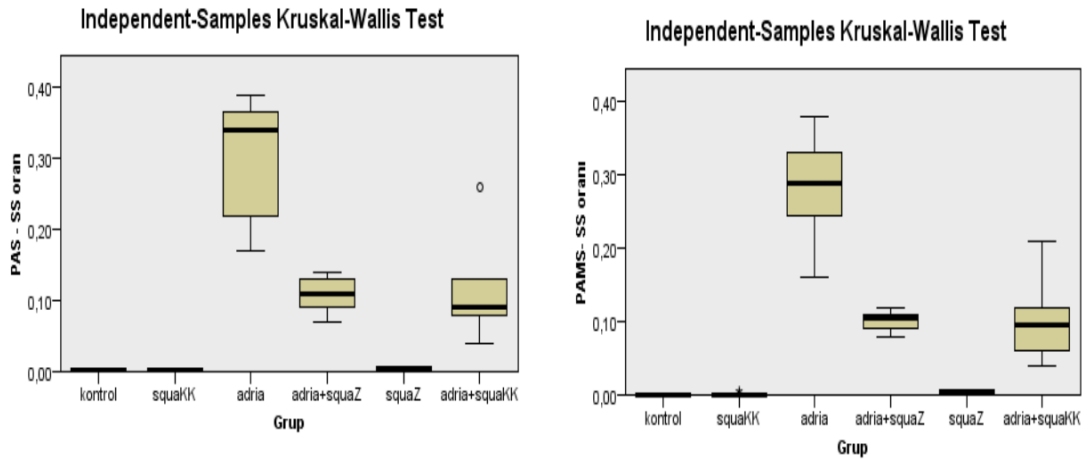


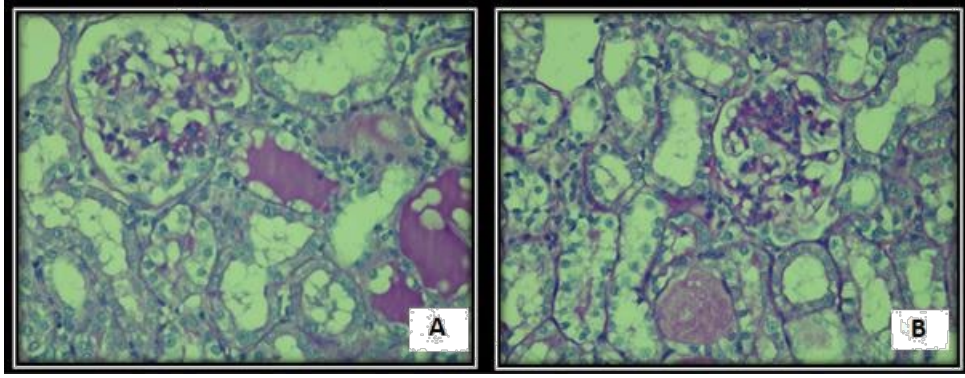
4.1.8.2. Grupların PAS ve PAMS histokimyasal boyaları ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları

PAS ile değerlendirilen ortalama segmental skleroz (SS) skorları ADR grubunda; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı ($p=0.01$, $p=0.003$ ve $p<0.0001$). PAMS ile değerlendirilen ortalama segmental skleroz (SS) skorları da ADR grubunda; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı ($p=0.006$, $p=0.006$ ve $p<0.0001$) (Şekil 10).

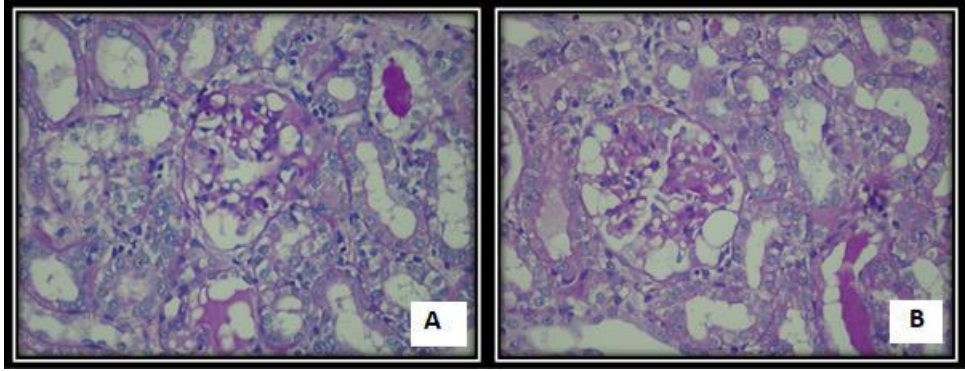
ADR+SQ-Z ve ADR+SQ-KK gruplarının PAS ve PAMS ile değerlendirilen ortalama SS skorları, kontrol grubuna göre daha yüksek, ADR grubuna göre ise daha düşük bulundu. Ancak bu gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı (Şekil-13).

Şekil 10: Grupların PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skor ortalamaları

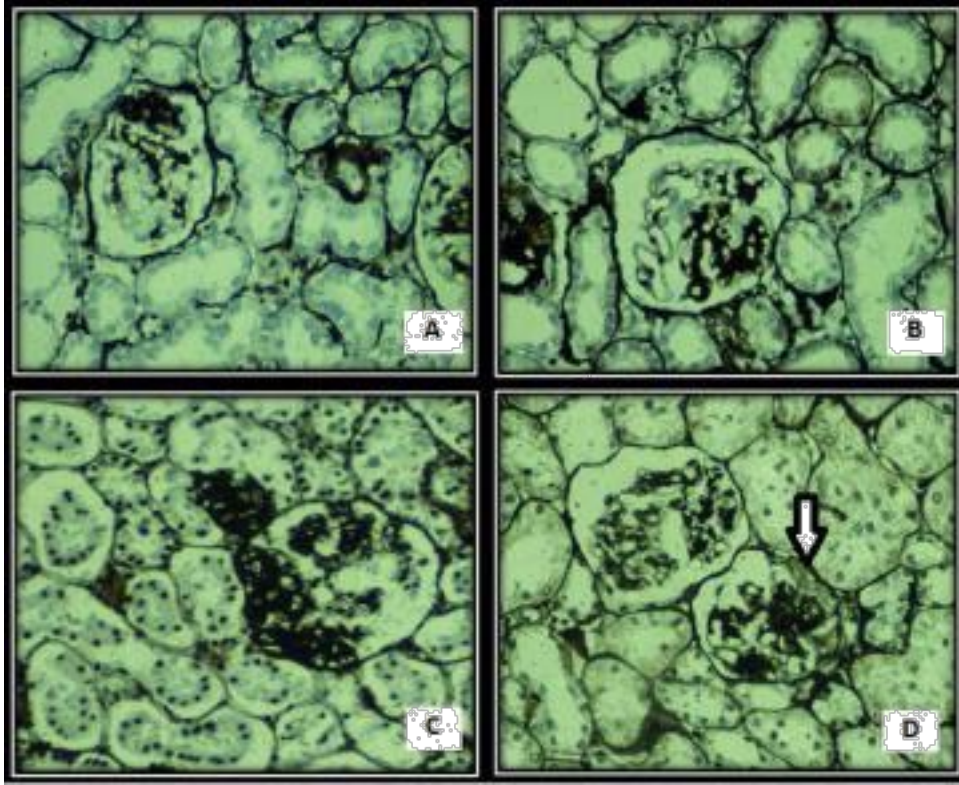




Resim 3: PAS histokimyasında glomerüler segmental skleroz skorlaması
A: Skor 1 (%25'in altında), B Skor 2 (%25 ile %50 arasında)



Resim 4: PAS histokimyasında glomerüler segmental skleroz skorlaması
A: Skor 3 (%50 ile 75 arasında), B Skor 4 (%75'in üzerinde)



Resim 5: PAMS histokimyasında glomerüler segmental skleroz skorlaması (X40)

A: Skor 1 (%25'in altında), B Skor 2 (%25 ile 50 arasında), C: Skor 3 (%50 ile 75 arasında), D Skor 4 (Ok ile işaretli, %75'in üzerinde)

4.1.8.3. Grupların en yüksek segmental skleroz skorları

Grupların en yüksek segmental skleroz skorlarına ilişkin veriler tablo 12'de verilmiştir. Buna göre en yüksek SS skorları ADR grubunda gözlenmiştir. ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarındaki en yüksek segmental skleroz skorlarının; ADR grubuna göre daha düşük, kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre ise daha yüksek olduğu saptanmakla birlikte istatistiksel olarak yorumlamak uygun olmamıştır.

Tablo 12: Grupların en yüksek segmental skleroz skor dağılımı

Grup	N	En yüksek segmental skleroz skorları	Yüzde
Kontrol	3	<%25	100,0

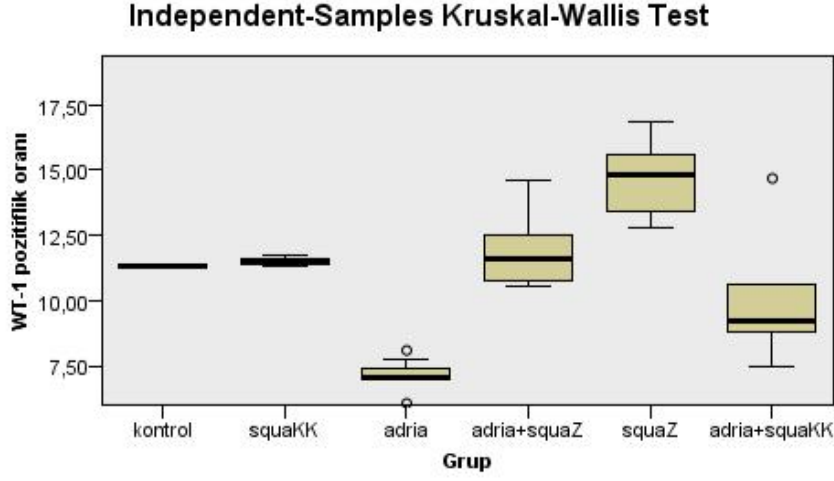
SQ-KK	2	yok	28,6
	3	<%25	42,9
	2	%25-%50	28,6
SQ-Z	1	yok	16,7
	3	<%25	50,0
	2	%25-%50	33,3
ADR	1	%25-%50	14,3
	4	%50-%75	57,1
	2	>%75	28,6
AR+SQ-KK	1	%25-%50	16,7
	5	%50-%75	83,3
ADR+SQ-Z	2	%25-%50	28,6
	4	%50-%75	57,1
	1	>%75	14,3

4.1.8.4. Grupların WT-1 değerleri

Ortalama WT-1 değerleri, ADR grubunda; SQ-KK, SQ-Z ve ADR+SQ-Z gruplarına göre anlamlı düzeyde daha düşük saptandı ($p=0.025$, $p<0.0001$ ve $p=0.031$). En yüksek WT-1 değerlerinin ortalaması ADR grubunda; SQ-KK ve SQ-Z gruplarına göre anlamlı düzeyde daha düşük saptandı ($p=0.002$ ve $p=0.024$). Kontrol grubunun da en yüksek WT-1 değeri ortalaması, ADR grubuna göre belirgin düzeyde daha yüksek olmasına rağmen, bu iki grup arasındaki farkta istatistiksel anlamlılık saptanmadı. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

En düşük WT-1 değerlerinin ortalaması ADR grubunda; SQ-KK, SQ-Z ve ADR+SQ-Z gruplarına göre anlamlı düzeyde daha düşük saptandı ($p=0.049$, $p<0.0001$ ve $p=0.025$). ADR+SQ-KK grubunun da ortalama, en yüksek ve en düşük WT-1 değerleri; ADR grubuna göre daha yüksek saptanmakla birlikte, kontrol, SQ-KK ve SQ-Z gruplarına göre daha düşük saptandı. Ancak istatistiksel olarak ADR+SQ-KK ile SQ-Z grubu arasında ortalama WT-1 değerleri arasında anlamlı fark saptanırken ($p=0.034$), diğer gruplar ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı (Şekil 11).

Şekil 11: Grupların WT-1 değerlerinin ortalamaları

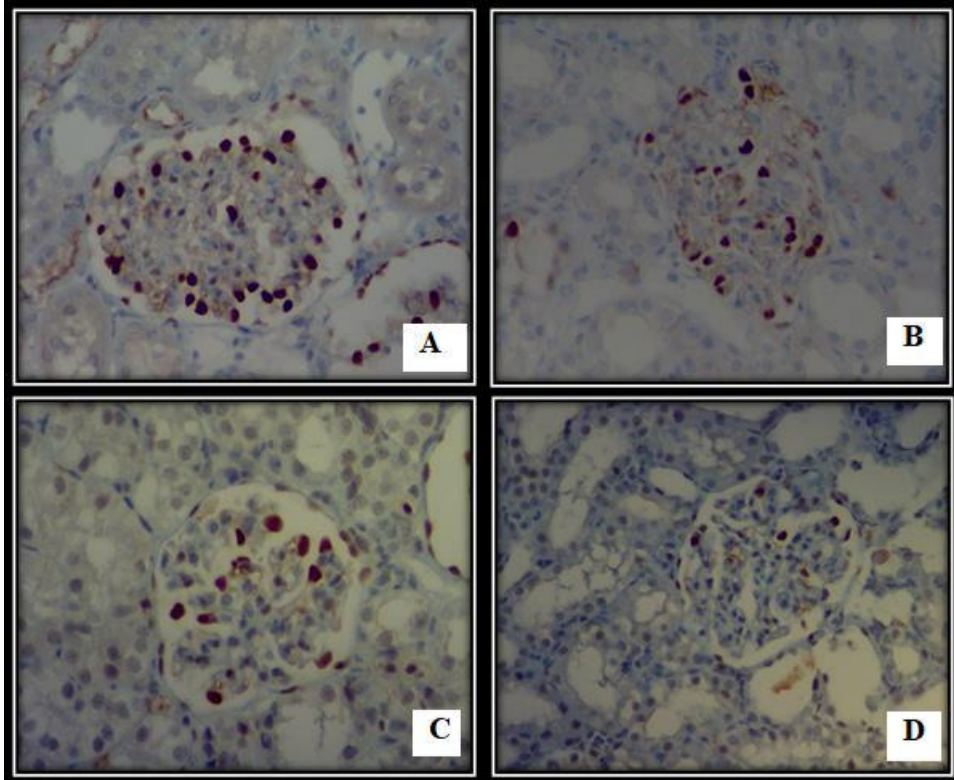


Grupların ortalama, en yüksek ve en düşük WT-1 değerlerinin ortalamaları ve standart sapmalarına ait veriler tablo 13’da verilmiştir.

Tablo 13: Grupların skor ortalaması ve ölçümsel verilerinin ortalama ve std sapma değerleri

GRUP	Ort. Bowman alanı	Ort. Glomerüler yumak alanı	Ort. PAS-SS skoru	Ort. PAMS- SS skoru	Ort. WT- 1	En yüksek WT-1	En düşük WT-1
Kontrol	15784±1363	11283±294	0.0023±0.005	0.0010±0.001	11.32±0.08	23.33± 1.15	6.67± 0.57
SQ-KK	16362±661.7	11427±348	0.0021±0.001	0.0012±0.001	11.51±0.14	24.57± 3.5	7.43± 1.27
SQ-Z	15683±1638	10849±1134	0.0038±0.0031	0.004±0.0026	14.71±1.52	22.17± 3.71	9.67± 1.63
ADR	10316±1115	6803±1076	0.2957±0.090	0.2828±0.079	7.15±0.64	13.57± 3.10	3±0.8 1
ADR+SQ- KK	15433±2448	9109±748	0.1150±0.78	0.1033±0.095	9.99±2.51	16.17± 4.21	5.67± 2.67

ADR+SQ-Z	13395±1613	8516±841	0.1083±0.26	0.1016±0.014	11.86±1.50	17.43±	7.57±
						2.37	1.61



Resim 6: Gruplara ait glomerüllerde immünohistokimyasal WT-1 boyanmaları (X40)

A: Kontrol, B: Adriamisin+Skualen-KK, C: Adriamisin+Skualen-Z, D: Adriamisin

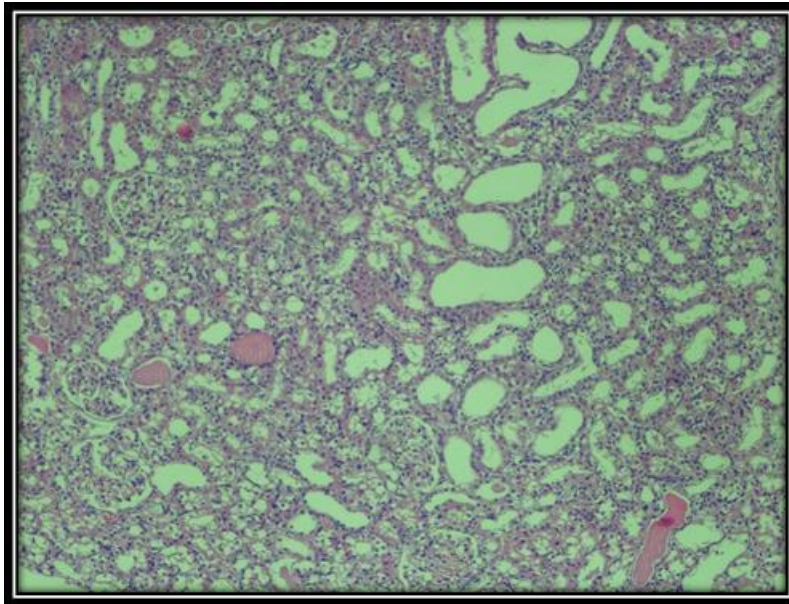
4.1.8.5. Grupların interstisyel enflamasyon ve tübüler hasar skorları

Kontrol, SQ-K ve SQ-Z gruplarındaki tüm sıçanlarda interstisyel enflamasyon ve tübüler hasar bulguları tüm böbrek biyopsisinin %10'undan azında (skor 0) izlenmiştir. ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarına ait hiçbir sıçan interstisyel enflamasyon skorundan 2 puan (%25-50 arası) almamıştır. ADR grubunda ise 7 sıçandan, 4 tanesi bu skordan 2 puan (%25-50 arası) almıştır. ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarında interstisyel enflamasyon

skorları; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre daha yüksek olmakla birlikte, ADR grubuna göre daha düşük saptanmıştır.

ADR+SQ-Z ve ADR+SQ-KK gruplarına ait hiçbir sıçan tübüler hasarlanma skorundan 3 puan (>%50) almamıştır. ADR+SQ-Z ve ADR+SQ-KK gruplarına ait en yüksek tübüler hasarlanma skoru 2 olup, ADR+SQ-Z grubundan 1 adet, ADR+SQ-KK grubundan ise 3 adet sıçan 2 olarak sonlandırılmıştır. ADR grubunda ise sıçanların 1 tanesinin tübüler hasar skoru 3 olup, kalan tüm sıçanların skoru 2 olarak değerlendirilmiştir.

ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarında tübüler hasarlanma ve interstisyel enflamasyon skorları; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre daha yüksek olmakla birlikte, ADR grubuna göre daha düşük saptanmıştır. Bu bulgular ile birlikte veri sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel açıdan p değeri verilememiştir. Grupların interstisyel enflamasyon ve tübüler hasar skorlarına ilişkin veriler tablo 14 ve 15’de verilmiştir.



Resim 7: ADR uygulanan gruplarda izlenen interstisyel enflamasyon ve tübüler hasarlanma bulguları H&E (X10)

Tablo 14: Grupların interstisyel enflamasyon skor verileri

Grup	N	İnterstisyel enflamasyon skorları	Yüzde
Kontrol	3	<%10	100,0
SQ-KK	7	<%10	100,0
SQ-Z	6	<%10	100,0
ADR	3	%10-%25	42,9
	4	%25-%50	57,1
ADR+SQ-KK	3	<%10	50,0
	3	%10-%25	50,0
ADR+SQ-Z	4	<%10	57,1
	3	%10-%25	42,9

Tablo 15: Grupların tübüler hasar skor verileri

Grup	N	Tübüler Hasar skorları	Yüzde
Kontrol	3	<%10	100,0
SQ-KK	7	<%10	100,0
SQ-Z	6	<%10	100,0
ADR	6	%25-%50	85,7
	1	>%50	14,3
ADR+SQ-KK1		<%10	16,7
	2	%10-%25	33,3
	3	%25-%50	50,0
ADR+SQ-Z	6	%10-%25	85,7
	1	%25-%50	14,3

4.1.8.6. Grupların interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulguları

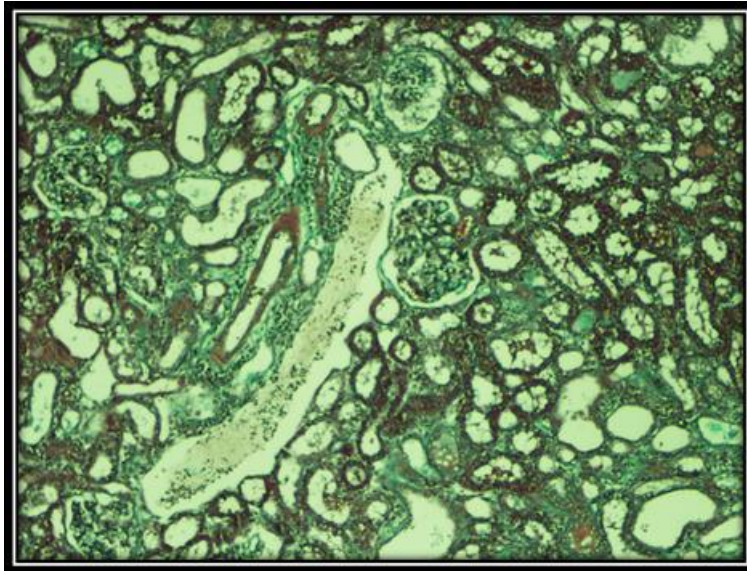
Tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis bulguları gözlenen sıçanların tümünde, bulguların böbreklerin %25'ten azını etkilediği gözlemlendi.

Kontrol, SQ-K ve SQ-Z gruplarındaki sıçanlarda interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulguları izlenmedi (skor:0).

ADR grubundaki sıçanların 6 tanesinde interstisyel fibrozis, 4 tanesinde tübüler atrofi bulguları böbrek biyopsisinin %25'inden azında gözlemlendi (skor:1).

ADR+SQ-KK grubundaki sıçanların hiçbirinde tübüler atrofi bulguları izlenmemiş olup, 1'inde interstisyel fibrozis skoru 1 olarak değerlendirilmiştir.

ADR+SQ-Z grubundaki sıçanların 1'sinde tübüler atrofi, 2'sinde ise interstisyel fibrozis skoru 1 olarak değerlendirildi.



Resim 8: Hafif düzeyde izlenen interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulguları; Masson (X20)

ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarında interstisyel fibrozis skorları; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre daha yüksek olmakla birlikte, ADR grubuna göre daha düşük saptandı. Yine ADR+SQ-Z gruplarında interstisyel fibrozis skorları; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre daha yüksek olmakla birlikte, ADR grubuna göre daha düşük saptandı.

Tablo 16 : Grupların interstisyel fibrozis skor verileri

Grup	N	İnterstisyel fibrozis	Yüzde
Kontrol	3	Yok	100,0

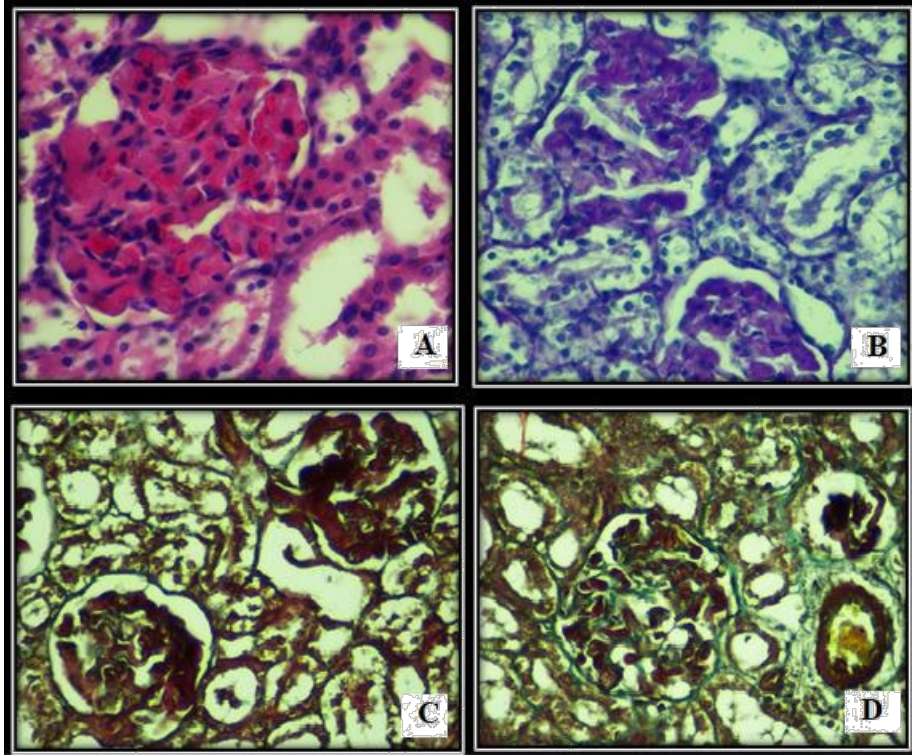
SQ-KK	7	Yok	100,0
SQ-Z	6	Yok	100,0
ADR	1	Yok	14,3
	6	<%25	85,7
ADR+SQ-KK	5	Yok	83,3
	1	<%25	16,7
ADR+SQ-Z	5	Yok	71,4
	2	<%25	28,6

Tablo 17: Grupların tübüler atrofi skor verileri

Grup	N	Tübüleratrofi	Yüzde
Kontrol	3	Yok	100,0
SQ-KK	7	Yok	100,0
SQ-Z	6	Yok	100,0
ADR	3	Yok	42,9
	4	<%25	57,1
ADR+SQ-KK	6	Yok	100,0
ADR+SQ-Z	6	Yok	85,7
	1	<%25	14,3

4.1.8.7. Grupların TMA bulguları

Trombotik mikroanjiopati bulguları izlenen böbreklerin tümünde morfolojik bulgular akut TMA ile uyumlu izlendi. ADR grubundaki sıçanların 1'inde fokal; ADR+ SQ-KK grubundaki sıçanların 2'sinde yaygın, 1'inde fokal TMA bulguları gözlemlendi. TMA bulguları baskın olarak glomerüllerde izlenirken, bazı arteriollerde de görüldüğü dikkati çekti. Diğer gruplardaki sıçanlarda TMA bulgusu gözlenmedi.



Resim 9: TMA bulguları (x40)

A: H&E glomerüler akut TMA bulguları, B: PAS histokimyası ile glomerüler akut TMA bulguları, C: Masson histokimyası ile glomerüler akut TMA bulguları, D: Masson histokimyası ile glomerüler ve arteriolar akut TMA bulguları

4.1.8.8. Grupların tıkalıcı arteriopati bulguları:

Vasküler lümeni daraltacak veya oklüde edecek şekilde PAS pozitif materyal birikimi veya intimada mukoid kalınlaşma olarak tanımlanan vasküler lezyonlar sıçanların hiçbirinde gözlenmedi.

4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULARIN, KAN VE İDRAR ÖLÇÜTLERİNİN BİRBİRLERİ İLE İLİŞKİLERİ

4.2.1. Kan analizlerinin kendi aralarında ilişkileri

Kan BUN değerleri ile kan kreatinin değerleri arasında orta düzeyde korelasyon saptandı ($p=0.002$, $r=0.509$). Kan BUN değerleri ile kan total protein ve albümin değerleri arasında ters ilişkili olarak yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p<0.001$, $r_1=-0.811$ ve $r_2=-0.814$). Kan kreatinin değerleri ile; kan total protein ($p=0.009$, $r=-0.429$) ve albümin ($p=0.006$,

$r=-0.447$) değerleri arasında ters ilişkili orta düzeyde anlamlılık saptandı. Kan total protein ile albümin düzeyleri arasında ise çok yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r=0.906$).

4.2.2. Kan analizlerinin WT-1 değerleri ile ilişkileri

Ortalama WT-1 değerlerinin, kan BUN değerleri ile arasında düşük ($p=0.044$, $r=-0.338$), kan kreatinin değerleri ile arasında orta düzeyde ($p=0.001$, $r=-0.544$) ters ilişkili korelasyon saptandı. Ortalama WT-1 değerlerinin, kan total protein değerleri ile arasında orta düzeyde ($p=0.011$, $r=0.418$), doğrusal ilişkili korelasyon saptanırken, kan albümin değerleri ile arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı. En yüksek WT-1 değerleri ile kan BUN ve kreatinin ölçümleri ile orta düzeyde, ters ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r_1=-0.591$ ve $r_2=-0.553$). En yüksek WT-1 değerlerinin kan total protein ve albümin değerleri ile arasında yüksek düzeyde, doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r_1=0.74$ ve $r_2=0.693$). En düşük WT-1 değerlerinin, kan kreatinin değerleri ile arasında orta düzeyde ($p=0.001$, $r=-0.537$) ters ilişkili korelasyon saptanırken, kan BUN değerleri ile arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı. En düşük WT-1 değerlerini, kan total protein değerleri ile arasında düşük düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptanırken ($p=0.036$, $r=0.35$), kan albümin değerleri ile arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı.

4.2.3. Kan analizlerinin segmental skleroz skorları ile ilişkileri

PAS histokimyası ile değerlendirilen segmental skleroz skorlarının ortalamalarının; kan BUN ve kreatinin değerleri ile doğrusal ilişkili, kan albümin değerleri ile ters ilişkili olmak üzere yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r_1=0.782$, $r_2=0.739$ ve $r_3=-0.732$). PAS ile değerlendirilen segmental skleroz skorlarının ortalaması ile kan total protein değerleri arasında çok yüksek düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r=-0.844$).

PAMS histokimyası ile değerlendirilen segmental skleroz skorlarının ortalamalarının; kan BUN ve kreatinin değerleri ile doğrusal ilişkili, kan albümin değerleri ile ters ilişkili olmak üzere yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r_1=0.777$, $r_2=0.663$ ve $r_3=-0.792$). PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skorlarının ortalamalarının, kan total protein değerleri ile arasında çok yüksek düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r=-0.875$).

En yüksek segmental skleroz skorlarının artışı ile kan BUN değerlerinin yüksekliği arasında anlamlı ilişki saptandı ($p<0.001$). En yüksek segmental skleroz skor değerleri arttıkça, kan kreatinin düzeylerinde de artış izlendi, fakat istatistiksel olarak anlamlılık

saptanmadı. En yüksek segmental skleroz skorlarının artışı ile, kan total protein ve albümin düzeylerinin düşüşü arasında anlamlı ilişki saptandı ($p_1=0.003$, $p_2=0.001$).

4.2.4. Kan analizlerinin Bowman ve glomerüler yumak alanları ile ilişkileri

Ortalama Bowman alanlarının; kan BUN ve kreatinin değerleri ile arasında orta düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı ($p=0.002$, $r_1=-0.51$ ve $r_2=-0.517$). Ortalama Bowman alanlarının; kan total protein ve albümin değerleri ile arasında orta düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p_1<0.0001$, $r_1=.577$ ve $p_2=0.005$, $r_2=0.476$).

Ortalama glomerüler yumak alanlarının; kan BUN ve kreatinin değerleri ile arasında yüksek düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r_1=-0.699$ ve $r_2=-0.612$). Ortalama glomerüler yumak alanlarının; kan total protein ve albümin değerleri ile arasında yüksek düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r_1=0.786$ ve $r_2=0.724$).

4.2.5. Kan analizlerinin tübülointerstisyel alanda izlenen morfolojik bulgular ile ilişkileri

Tübüler hasar bulgularının şiddeti ile; kan BUN ve kreatinin değerlerinin yüksekliği arasında, anlamlı ilişki saptandı ($p_1<0.001$, $p_2=0.005$). Tübüler hasar bulgularının şiddeti ile; kan total protein ve albümin değerlerinin düşüklüğü arasında anlamlı ilişki saptandı. ($p_1<0.001$, $p_2=0.001$) Tübüler hasar ile interstisyel enflamasyon bulguları arasında çok yüksek düzeyde, doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.001$, $r=0.862$)

İnterstisyel enflamasyon skorlarının yüksekliği ile; kan BUN ve kreatinin değerlerinin yüksekliği arasında, anlamlı ilişki saptandı ($p_1=0.001$, $p_2=0.004$). İnterstisyel enflamasyon skorlarının yüksekliği ile; kan total protein ve albümin değerlerinin düşüklüğü arasında, anlamlı ilişki saptandı ($p_1=0.009$, $p_2=0.013$).

İnterstisyel fibrozis bulgularının kan BUN, kreatinin, total protein ve albümin değerleri ile arasında anlamlı düzeyde ilişki saptandı ($p_1=0.003$, $p_2=0.003$, $p_3=0.002$ ve $p_4=0.005$).

Tübüler atrofi bulgularının kan BUN, kreatinin ve total protein değerleri ile arasında anlamlı düzeyde ilişki saptanırken ($p_1=0.01$, $p_2=0.027$ ve $p_3=0.017$), kan albümin değerleri ile arasında anlamlı düzeyde ilişki saptanmadı.

4.2.6. İdrar ölçütlerinin kendi aralarında ilişkileri

14.gün ve 22.gün idrar hacimleri arasında orta düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p=0.001$, $r=0.563$). 14.gün idrar hacimleri ile 14.gün idrar protein değerleri arasında düşük düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı ($p=0.027$, $r=0.38$). 14.gün idrar hacimleri ile

14.gün idrar kreatinin ve üre değerleri arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı. 14.gün idrar protein değerleri ile 14.gün idrar üre ve kreatinin değerleri arasında orta düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı ($p1=0.001$, $r1=-0.545$ ve $p2=0.02$, $r2=-0.403$). 14.gün idrar kreatinin ve üre değerleri arasında çok yüksek düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r=0.83$).

22.gün idrar hacimlerinin; 22.gün idrar protein değerleri ile düşük ($p=0.038$, $r=0.381$), 22.gün idrar kreatinin değerleri ile arasında orta düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptandı. ($p=0.001$, $r=0.563$). 22.gün idrar hacimleri ile 22.gün idrar üre değerleri arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı. 22.gün idrar protein değerleri ile 22.gün idrar üre değerleri arasında yüksek düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı (<0.001). 22. gün idrar kreatinin değerlerinin, 22.gün idrar protein ve üre değerleri ile arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı. 14.gün idrar protein değerleri ile 22.gün idrar protein değerleri arasında çok yüksek düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r=0.87$). 14.gün idrar üre değerleri ile 22.gün idrar üre değerleri arasında yüksek düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.0001$, $r=0.658$). 14.gün idrar kreatinin değerleri ile 22.gün idrar kreatinin değerleri arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı.

Ayrıca 14. ve 22. gün idrar proteinüri değerleri arasındaki farkın, idrar kreatinin değerleri arasındaki fark ile arasında orta düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon izlendi ($p=0.014$, $r=0.469$). 14. ve 22. gün idrar üre değerleri arasındaki farkın, idrar kreatinin ve proteinüri değerleri arasındaki fark ile arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı.

4.2.7. İdrar ölçütlerinin segmental skleroz skorları ile ilişkileri

4.2.7.1. 14. gün idrar ölçütlerinin segmental skleroz skorları ile ilişkileri

14.gün idrar hacimlerinin; PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları ve en yüksek segmental skleroz skoru ile arasında orta düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p1=0.007$, $r1=0.448$; $p2=0.009$, $r2=0.433$ ve $p3=0.021$, $r3=0.384$). PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları ile 14.gün idrar proteinüri değerleri arasında yüksek düzeyde ($p1<0.0001$, $r1=0.798$ ve $p2<0.0001$, $r2=0.782$), en yüksek SS skoru ile 14.gün idrar proteinüri düzeyleri arasında ise çok yüksek düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon ($p<0.0001$, $r=0.821$) saptandı.

PAS ve PAMS değerlendirilen segmental skleroz skorları ve en yüksek segmental skleroz skoru ile 14.gün idrar üre değerleri arasında orta düzeyde ters ilişkili korelasyon

saptandı ($p_1=0.001$, $r=-0.537$; $p_2=0.001$, $r_2=-0.560$ ve $p_3<0.001$, $r_3=-0.546$). PAS ve PAMS değerlendirilen segmental skleroz skorları ve en yüksek segmental skleroz skoru ile 14.gün idrar kreatinin değerleri arasında orta düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı ($p_1=0.011$, $r_1=-0.431$; $p_2=0.007$, $r_2=0.454$ ve $p_3=0.021$, $r_3=-0.458$).

4.2.7.2. 22. gün idrar ölçütlerinin segmental skleroz skorları ile ilişkileri

22.gün idrar hacimlerinin, PAS ve PAMS ile değerlendirilen ortalama segmental skleroz skor ortalamaları ve en yüksek segmental skleroz skoru ile arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı. PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamalarının 22.gün idrar protein değerleri ile arasında çok yüksek düzeyde ($p_1<0.0001$, $r_1=0.864$ ve $p_2<0.0001$, $r_2=0.815$); en yüksek SS skorlarının 22.gün idrar protein düzeyleri ile arasında ise yüksek düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon ($p<0.001$, $r=0.799$) saptandı.

PAS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamalarının, 22.gün idrar üre değerleri ile arasında yüksek ($p<0.001$, $r=-0.743$); PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamalarının 22.gün idrar üre değerleri ile arasında ise çok yüksek düzeyde ($p<0.001$, $r=-0.813$) ters ilişkili korelasyon saptandı. En yüksek segmental skleroz skorlarının, 22.gün idrar üre değerleri ile arasında yüksek düzeyde ($p<0.001$, $r=-0.79$) ters ilişkili korelasyon saptandı. PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları ve en yüksek segmental skleroz skorlarının 22.gün idrar kreatinin değerleri ile arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı.

4.2.8. İdrar ölçütlerinin WT-1 değerleri ile ilişkileri

14.gün idrar hacimlerinin ortalama WT-1 değerleri ile orta ($p=0.008$, $r=-0.433$), en yüksek ve en düşük WT-1 değerleri ile düşük ($p_1=0.02$, $r_1=-0.385$ ve $p_2=0.017$, $r_2=-0.395$) düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı. 22.gün idrar hacimleri ile ortalama WT-1 ve en düşük WT-1 değerleri arasında orta düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı ($p_1=0.004$, $r_1=-0.512$ ve $p_2=0.007$, $r_2=-0.479$). 22.gün idrar hacimlerinin en yüksek WT-1 değerleri ile arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı.

Ortalama WT-1, en yüksek WT-1 ve en düşük WT-1 değerlerinin; 14.gün idrar protein ölçümleri ile arasında ters ilişkili ($p_1<0.001$, $r_1=-0.575$; $p_2<0.001$, $r_2=-0.685$ ve $p_3=0.001$, $r_3=-0.538$), 14.gün idrar kreatinin ($p_1=0.003$, $r_1=0.489$; $p_2=0.003$, $r_2=0.490$ ve $p_3=0.004$, $r_3=0.477$) düzeyleri ile doğrusal ilişkili orta düzeyde korelasyon izlendi. Ortalama WT-1 ve

en yüksek WT-1 değerlerinin, idrar üre düzeyleri ile arasında orta düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon ($p_1=0.015$, $r_1=0.408$; $p_2=0.001$, $r_2=0.494$) saptanırken, en düşük WT-1 değerleri ile idrar üre düzeyleri arasında anlamlı düzeyde korelasyon izlenmedi.

Ortalama WT-1, en yüksek WT-1 ve en düşük WT-1 değerleri ile 22.gün idrar protein ölçümleri ile ters ilişkili yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p_1<0.0001$, $r_1=-0.607$; $p_2<0.001$, $r_2=-0.708$ ve $p_3<0.001$, $r_3=-0.617$). En yüksek WT-1 ve ortalama WT-1 değerleri ile 22.gün idrar kreatinin ölçümleri arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı. 22.gün üre ölçümlerinin en yüksek WT-1 değerleri ile yüksek ($p<0.001$, $r=0.718$), ortalama WT-1 değerleri ile orta ($p=0.013$, $r=0.448$), en düşük WT-1 değerleri ile zayıf ($p=0.039$, $r=0.379$) düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptandı.

4.2.9. İdrar ölçütlerinin Bowman ve glomerüler yumak alan ölçümlerinin ile ilişkileri

14.gün idrar hacimlerinin ortalama Bowman alanları ile arasında orta ($p=0.006$, $r=-0.45$), glomerüler yumak alanları ile arasında ise düşük düzeyde ($p=0.044$, $r=-0.388$) ters ilişkili korelasyon saptandı. 14.gün idrar protein değerlerinin, ortalama Bowman alanı ile düşük ($p=0.027$, $r=-0.38$), ortalama glomerüler yumak alanları ile yüksek ($p<0.001$, $r=-0.66$) düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı. Ortalama Bowman ve glomerüler yumak alanlarının, 14.gün idrar kreatinin değerleri ile arasında orta düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p_1=0.004$, $r_1=0.471$ ve $p_2<0.001$, $r_2=0.564$). 14.gün idrar üre değerlerinin, ortalama Bowman alanı ile orta ($p=0.012$, $r=0.418$), ortalama glomerüler yumak alanları ile yüksek düzeyde ($p<0.001$, $r=0.621$) doğrusal ilişkili korelasyon saptandı.

22.gün idrar hacimleri ile ortalama Bowman ve glomerüler yumak alanları arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı. 22. gün idrar protein değerleri ile, ortalama Bowman ve glomerüler yumak alanları arasında ters ilişkili yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p_1<0.001$, $r_1=-0.694$ ve $p_2<0.001$, $r_2=-0.778$). 22. gün idrar üre değerleri ile, ortalama Bowman ve glomerüler yumak alanları arasında doğrusal ilişkili, çok yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p_1<0.001$, $r_1=0.821$ ve $p_2<0.001$, $r_2=0.845$). 22. gün idrar kreatinin değerleri ile, ortalama Bowman ve glomerüler yumak alanları arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı.

4.2.10. İdrar ölçütlerinin tübüler ve interstisyel alanlarda izlenen morfolojik bulgular ile ilişkileri

4.2.10.1 Tübüler hasarlanma bulgularının idrar ölçütleri ile ilişkisi

Tübüler hasarlanma bulgularının şiddeti ile 14. ve 22. gün idrar hacimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. Tübüler hasarlanma bulgularının şiddetiyle 14. ve 22. gün idrar proteinüri değerleri ile arasında anlamlı ilişki saptandı ($p_1=0.001$, $p_2<0.001$). Tübüler hasarlanma bulgularının şiddeti arttıkça, 14. ve 22.gün idrar kreatinin değerlerinin düştüğü izlendi ve aralarında anlamlı ilişki saptandı ($p_1= 0.021$, $p_2=0.013$). Tübüler hasarlanma bulgularının şiddeti arttıkça, 14. ve 22.gün idrar üre değerlerinin düştüğü izlendi ve aralarında anlamlı ilişki saptandı ($p_1= 0.003$, $p_2<0.001$).

4.2.10.2 İnterstisyel enflamasyon skorlarının idrar ölçütleri ile ilişkisi

İnterstisyel enflamasyon skorları arttıkça 14. ve 22. güne ait idrar hacimlerinin arttığı izlendi ve aralarında anlamlı ilişki saptandı ($p_1=0.006$, $p_2=0.003$). İnterstisyel enflamasyon skorları arttıkça 14. ve 22. güne ait idrar proteinüri değerlerinin de arttığı izlendi ve aralarında anlamlı ilişki saptandı ($p_1=0.005$, $p_2<0.001$). İnterstisyel enflamasyon skorları ile 14. gün idrar kreatinin değerleri arasında anlamlı ilişki saptanmazken; İnterstisyel enflamasyon skorları arttıkça 22. güne ait idrar kreatinin değerlerinin de arttığı izlendi ve aralarında anlamlı düzeyde ilişki saptandı ($p=0.037$). İnterstisyel enflamasyon skorları arttıkça 14. ve 22. güne ait idrar üre değerlerinin azaldığı izlendi ve aralarında anlamlı ilişki saptandı ($p_1=0.024$, $p_2=0.003$).

4.2.10.3 İnterstisyel fibrozis bulgularının idrar ölçütleri ile ilişkisi

İnterstisyel fibrozis ile, 14. ve 22. gün idrar hacimleri arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı. İnterstisyel fibrozis ile, 14. ($p=0.047$) ve 22. gün idrar proteinüri ($p<0.001$) değerleri arasında anlamlı ilişki saptandı. İnterstisyel fibrozis ile, 14. gün idrar kreatinin değerleri arasında anlamlı ilişki saptanırken ($p=0.025$), 22. gün idrar kreatinin değerleri ile arasında anlamlılık saptanmadı. İnterstisyel fibrozis ile, 14. ($p=0.009$) ve 22. gün idrar üre ($p=0.001$) değerleri arasında anlamlı ilişki saptandı.

4.2.10.4 Tübüler atrofi bulgularının idrar ölçütleri ile ilişkisi

Tübüler atrofi bulguları ile; 14. ve 22. gün idrar hacimleri ve 14. ve 22. gün idrar kreatinin değerleri arasında anlamlı düzeyde ilişki saptanmadı. Tübüler atrofi ile 14. gün idrar proteinüri değerleri arasında anlamlı ilişki saptanmazken, 22. gün idrar proteinüri değerleri ile arasında anlamlı düzeyde ilişki saptandı ($p=0.008$). Tübüler atrofi ile 14. gün idrar üre

değerleri arasında anlamlı ilişki saptanmazken, 22. gün idrar üre değerleri ile arasında anlamlı düzeyde ilişki saptandı ($p=0.006$).

4.2.11. Kan ve idrar analizlerinin birbirleri arasındaki ilişkileri

4.2.11.1. Kan analizleri ile idrar proteinüri değerleri arasındaki ilişki

Kan BUN değerlerinin; 14. gün idrar proteinüri değerleri ile arasında çok yüksek ($p<0.001$, $r=0.805$), 22. gün proteinüri değerleri ile arasında ise yüksek düzeyde ($p<0.001$, $r=0.701$), doğrusal ilişkili korelasyon izlendi. Kan kreatinin değerlerinin; 14. ve 22.gün idrar proteinüri değerleri ile arasında yüksek düzeyde, doğrusal ilişkili korelasyon izlendi ($p1<0.001$, $r1=0.617$ ve $p2<0.001$, $r2=0.742$). Kan total protein değerlerinin; 14. ve 22.gün idrar proteinüri değerleri ile arasında, ters ilişkili çok yüksek düzeyde korelasyon izlendi ($p1<0.001$, $r1=-0.815$ ve $p2<0.001$, $r2=-0.831$). Kan albümin değerlerinin; 14. gün idrar proteinüri değerleri ile arasında çok yüksek ($p<0.001$, $r=-0.804$), 22. gün idrar proteinüri değerleri ile arasında yüksek düzeyde ($p<0.001$, $r=-0.754$), ters ilişkili korelasyon izlendi.

4.2.11.2. Kan analizleri ile idrar kreatinin değerleri arasındaki ilişki

14.gün idrar kreatinin değerlerinin; kan BUN değerleri ile yüksek ($p<0.001$, $r=-0.674$), kan kreatinin değerleri ile orta düzeyde ($p=0.019$, $r=-0.413$), ters ilişkili korelasyon saptandı. 14.gün idrar kreatinin değerlerinin; kan total protein ve albümin değerleri ile arasında doğrusal ilişkili, orta düzeyde korelasyon saptandı ($p1=0.017$, $r1=0.419$ ve $p1=0.017$, $r2=0.418$). 22.gün idrar kreatinin değerleri ile kan değerleri arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı.

4.2.11.3. Kan analizleri ile idrar üre değerleri arasındaki ilişki

14. ve 22. gün idrar üre değerlerinin, kan BUN değerleri ile arasında ters ilişkili yüksek düzeyde korelasyon izlendi ($p1<0.001$, $r1=-0.776$ ve $p2<0.001$, $r2=-0.791$). 14. ve 22. gün idrar üre değerlerinin, kan kreatinin değerleri ile arasında ters ilişkili orta düzeyde korelasyon izlendi ($p1=0.01$, $r1=-0.450$ ve $p2=0.002$, $r2=-0.544$). Kan total protein değerlerinin, 14. gün idrar üre değerleri ile arasında yüksek ($p<0.001$, $r=0.6$), 22.gün idrar üre değerleri ile arasında çok yüksek düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon izlendi ($p<0.001$, $r=0.815$). 14. ve 22. gün idrar üre değerlerinin, kan albümin değerleri ile arasında doğrusal ilişkili yüksek düzeyde korelasyon izlendi ($p1<0.001$, $r1=0.667$ ve $p2<0.001$, $r2=0.790$).

4.2.12. Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki farkın; idrar-kan ölçütleri ve histopatolojik bulgular ile ilişkileri

4.2.12.1. Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki farkın idrar ve kan ölçütleri ile ilişkisi

Sıçanların deney başlangıcındaki ve sonundaki ağırlıkları arasındaki farkın 14. ve 22. gün idrar hacimleri arasında anlamlı düzeyde ilişki saptanmadı. Ağırlık farkları ile; 14. ve 22. gün idrar arasında ters ilişkili, yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p_1 < 0.001$, $r_1 = -0.746$ ve $p_2 < 0.001$, $r_2 = -0.75$). Ağırlık farkları ile idrar üre değerleri arasında doğrusal yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p_1 < 0.001$, $r_1 = 0.67$ ve $p_2 < 0.001$, $r_2 = 0.762$). Ağırlık farkları ile 14.gün idrar kreatinin değerleri arasında doğrusal ilişkili yüksek düzeyde korelasyon saptanırken ($p < 0.001$, $r = 0.611$), 22. gün idrar kreatinin değerleri ile arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı.

Ağırlık farklarının; 14. ve 22. gün idrar proteinüri değerleri arasındaki fark ile arasında orta düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon izlendi ($p = 0.033$, $r = 0.404$). Ağırlık farklarının; 14. ve 22. gün idrar kreatinin ve üre değerleri arasındaki farkları ile aralarında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı. Ağırlık farklarının, kan total protein ve albümin değerleri ile arasında, doğrusal ilişkili çok yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p_1 < 0.001$, $r_1 = 0.833$ ve $p_2 < 0.001$, $r_2 = 0.814$). Ağırlık farklarının, kan BUN değerleri ile arasında çok yüksek ($p < 0.001$, $r = -0.857$), kan kreatinin değerleri ile arasında ise yüksek düzeyde ($p < 0.001$, $r = -0.599$), ters ilişkili korelasyon saptandı.

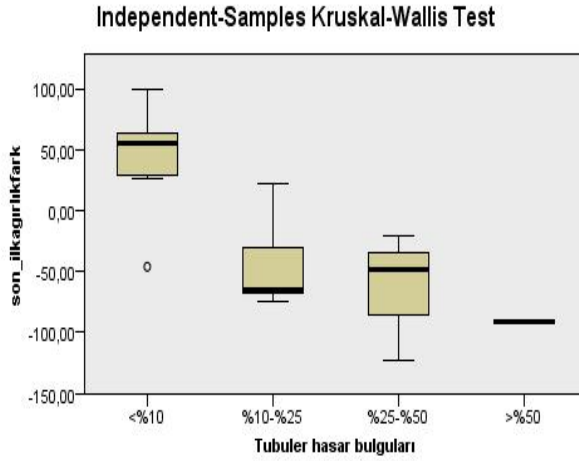
4.2.12.2. Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki farkın histopatolojik bulgular ile ilişkisi

Gruplar kendi içlerinde ayrı olarak değerlendirildiğinde, ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark ile PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları arasında korelasyon saptanmazken, tümü birlikte değerlendirildiğinde ilk ve son ağırlıklar arasındaki farkın; PAS-PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları ile arasında ters ilişkili, çok yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p_1 < 0.001$, $r_1 = -0.822$ ve $p_2 < 0.001$, $r_2 = -0.864$). İlk ve son ağırlıkları arasındaki fark ile ortalama Bowman alanları arasında yüksek ($p < 0.001$, $r = 0.623$), glomerüler yumak alanları arasında ise çok yüksek düzeyde ($p < 0.001$, $r = 0.827$) doğrusal ilişkili korelasyon saptandı.

Ağırlık farklarının ortalama ve en düşük WT-1 değerleri arasında orta ($p_1 = 0.001$, $r_1 = 0.533$ $p_2 = 0.007$, $r_2 = 0.444$); en yüksek WT-1 değerleri ile arasında ise yüksek düzeyde

($p<0.001$, $r=0.71$) doğrusal ilişkili korelasyon saptandı. Sıçanların deney başlangıcındaki ve sonundaki ağırlıkları arasındaki pozitif yönde farkın büyüklüğünün, interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulgularının varlığı ile arasında anlamlı düzeyde ilişkili olduğu saptandı ($p=0.001$ ve $p=0.004$). Sıçanların deney başlangıcındaki ve sonundaki ağırlıkları arasındaki pozitif yönde farkın büyüklüğü arttıkça, interstisyel enflamasyon ve tübüler hasar skorlarının da artış gösterdiği saptandı (Şekil 12). Ancak veri sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel olarak bu ölçüt için p değeri verilemedi.

Şekil 12: İlk-son ağırlıklar arasındaki fark ile tübüler hasar bulguları arasındaki ilişki



4.2.13. Böbrek ağırlıklarının kan ve idrar analizleri ile ilişkisi

Böbrek ağırlıklarının, idrar hacimleri ve biyokimyasal analizi yapılan idrar ve kan ölçütleri ile arasında anlamlı korelasyon saptanmadı.

4.2.14. Histopatolojik bulguların birbirleri arasındaki ilişkileri

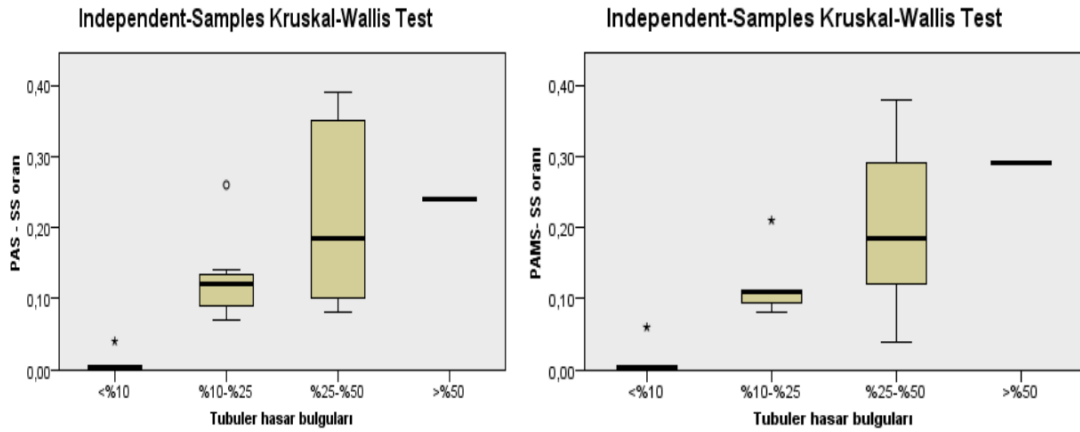
4.2.14.1. PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamalarının kendi aralarında ve diğer histopatolojik veriler ile ilişkisi

PAS ile PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları arasında çok yüksek düzeyde korelasyon ($p<0.001$, $r = 0.954$) saptandı. PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamalarının; ortalama WT-1 $p1<0.001$, $r1=-0.63$ ve $p2<0.001$, $r2=-0.646$ ve en yüksek WT-1 değerleri ($p1<0.001$, $r1=-0.732$ ve $p2<0.001$, $r2=-0.8$) ile arasında yüksek; en düşük WT-1 değerleri ile arasında ise orta düzeyde ($p1=0.001$, $r1=-0.549$ ve $p2=0.001$, $r2=-0.557$) ters ilişkili korelasyon saptandı.

PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamalarının; Bowman alan ortalamaları ile arasında yüksek düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı ($p_1 < 0.001$, $r_1 = -0.643$ ve $p_2 < 0.001$, $r_2 = -0.702$). PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamalarının; glomerüler yumak alan ortalamaları ile arasında ise çok yüksek düzeyde ters ilişkili korelasyon saptandı ($p_1 < 0.001$, $r_1 = -0.816$ ve $p_2 < 0.001$, $r_2 = -0.854$)

PAS ile PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamalarının; interstisyel fibrozis ($p < 0.001$) ve tübüler atrofi bulgularının ($p = 0.003$ ve $p = 0.002$) varlığı ile arasında anlamlı düzeyde ilişki saptandı. PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamalarının, tübüler hasar ve interstisyel enflamasyon bulgularının şiddeti ile arasında anlamlı düzeyde ilişki saptandı (Şekil 13). Ancak veri sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel olarak p değeri verilemedi.

Şekil 13: Tübüler hasar bulguları ile PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları arasındaki ilişki



4.2.14.2. En yüksek segmental skleroz skorlarının diğer histopatolojik veriler ile ilişkileri

PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skor ortalamaları arttıkça, en yüksek segmental skleroz skorunun da arttığı izlendi ve aralarında ilişki anlamlı saptandı ($p = 0.001$). En yüksek segmental skleroz skor değerleri arttıkça, ortalama Bowman ve glomerüler yumak alanlarının azaldığı izlendi ve aralarında anlamlı düzeyde ilişki saptandı ($p_1 = 0.048$, $p_2 = 0.007$). En yüksek segmental skleroz skor değerleri arttıkça ortalama WT-1 ve en yüksek WT-1 değerlerinin azaldığı izlendi ve aralarında anlamlı düzeyde ilişki saptandı ($p_1 = 0.018$, $p_2 = 0.016$). En yüksek segmental skleroz skorları ile interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi

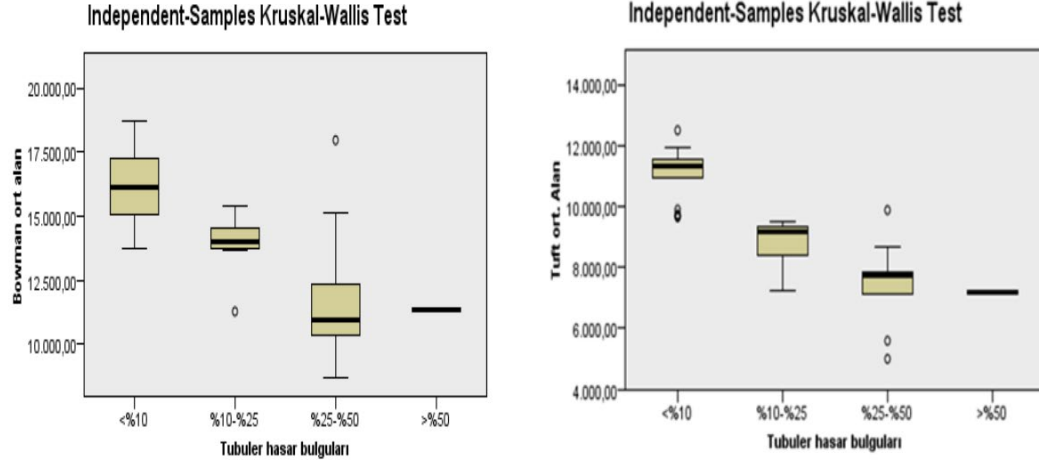
bulguları arasında orta düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon izlendi ($p_1=0.001$, $r_1=0.526$; $p_2=0.004$, $r_2=0.47$). Ayrıca en yüksek segmental skleroz skorlarının interstisyel enflamasyon ile arasında orta ($p<0.001$, $r=0.596$), tübüler hasar bulguları ile arasında ise yüksek düzeyde ($p<0.001$, $r=0.759$) doğrusal ilişkili korelasyon izlendi.

4.2.14.3. Bowman ve glomerüler yumak alanlarının diğer histopatolojik veriler ile ilişkisi

Ortalama glomerüler yumak alanları ile ortalama Bowman kapsülü alanları arasında çok yüksek düzeyde korelasyon saptandı ($p<0.001$, $r=0.868$). Ortalama Bowman kapsülü alanlarının; ortalama WT-1 değerleri ile arasında orta düzeyde ($p=0.001$, $r=0.537$), en yüksek WT-1 değerleri ile arasında ise yüksek düzeyde, doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.001$, $r=0.692$). Ortalama glomerüler yumak alanları ile; ortalama WT-1 ve en yüksek WT-1 değerleri arasında yüksek ($p_1<0.001$, $r_1=0.649$; $p_2<0.001$, $r_2=0.764$), en düşük WT-1 değerleri arasında orta düzeyde doğrusal ilişkili korelasyon saptandı ($p<0.001$, $r=0.568$).

Ortalama glomerüler yumak ile Bowman kapsülü alanlarının; tübüler hasar ve interstisyel enflamasyon bulgularının şiddeti ile arasında ters yönde ilişki saptandı ancak veri sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel yorum yapılamadı ve p değeri verilemedi (Şekil 14). Ortalama glomerüler yumak ile Bowman kapsülü alanlarının; interstisyel fibrozis ($p<0.001$) ve tübüler atrofi bulgularının ($p=0.001$) varlığı ile arasında ters yönde anlamlı ilişki saptandı.

Şekil 14: Tübüler hasar bulguları ile Bowman ve glomerüler yumak alan ortalamaları arasındaki ilişki



Böbrek ağırlıklarının Bowman – glomerüler yumak alanları, en yüksek segmental skleroz skoru, PAS ve PAMS ile değerlendirilen ortalama segmental skleroz skorları, tübüler hasar ve interstisyel enflamasyon bulguları ile arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı.

4.3. ÖNEMLİ BULGULAR

1- ADR uygulanan üç grupta da deneklerde 48. saatten itibaren deney sonuna kadar ağırlık kayıpları izlendi. Kontrol grubundaki sağlıklı hayvanların ağırlıkları ise deney sonuna kadar artış gösterdi. Köpekbalığı ve zeytinyağı kaynaklı SQ uygulanan gruplarda ise 96. Saate kadar ağırlık kaybı izlenmiş olup, sonrasında deney sonuna kadar kontrol grubu ile benzer eğride sürekli ağırlık artışı gözlemlendi.

2- 96. Saatte ise ADR uygulanan tüm grupların yem tüketimleri diğer gruplara göre daha düşük saptandı. 7. günde ADR-SQ-Z grubundaki sıçanların yem tüketimi kontrol, SQ-Z ve SQ-KK grupları ile benzer, sonraki ölçümlerde ise ADR ve ADR +SQ-KK gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

3- Adriyamisin uygulanan grupların tümünde, 48. Saat, 96. Saat, 7. gün, 10. gün ve 14. gündeki sıvı tüketiminin diğer gruplara göre daha az olduğu izlendi.

4- ADR uygulanan üç grupta da serum kreatinin ve BUN değerlerinde artış olduğu izlenirken; en yüksek kreatinin değerlerin ADR grubuna ait olduğu görüldü. ADR ile SQ-Z ve SQ-K gruplarının kreatinin değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanırken, ADR+SQ-Z ve ADR+SQ-KK gruplarının kreatinin değerleri ile; kontrol, SQ-Z ve SQ-K gruplarının kreatinin değerleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

5- ADR uygulanan tüm gruplarda kan total protein ve albümin düzeyleri, diğer gruplara göre düşük saptandı. Skualen ile birlikte ADR uygulaması ile kan total protein ve albümin düzeylerinde iyileşme görülmedi.

6- ADR+SQ-Z grubuna ait sıçanların 14. gün idrar proteinüri değerleri; ADR ve ADR+SQ-KK gruplarına göre daha düşük; kontrol, SQ-KK ve SQ-Z gruplarına göre ise daha yüksek saptanmakla birlikte, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. 22. günde idrar proteinüri değerlerinde ise, ADR'ye ek olarak SQ-Z uygulanan grubun proteinüri değerleri; yalnız ADR uygulanan gruba göre belirgin olarak düşük saptandı. İstatistiksel olarak da ADR grubu ile kontrol, SQ-KK ve SQ-Z gruplarının idrar proteinüri değerleri ile arasındaki fark anlamlı saptanırken, ADR+SQ-Z grubunun proteinüri değerleri ile kontrol, SQ-KK ve SQ-Z grupları arasındaki fark anlamlı saptanmadı.

7- İdrar üre ve kreatinin atılımlarının ADR uygulanan gruplarda düşük olduğu izlendi.

8- ADR ile birlikte SQ-KK ve SQ-Z uygulanan gruplar ile yalnız ADR uygulanan grup karşılaştırıldığında; SQ ile birlikte ADR uygulanan gruplarda segmental skleroz skor ortalama değerlerinin belirgin olarak daha düşük olduğu izlendi. Kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarının segmental skleroz skor ortalamaları ile ADR grubunun ortalama değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanırken; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK grupları ile ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z grupları arasındaki segmental skleroz skor ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı.

9- Segmental skleroz skorlarının ortalama değerleri arttıkça, total protein ve albümin ile idrar kreatinin ve üre değerlerinde düşme gözlenirken; idrar proteinüri, kan kreatinin ve BUN değerlerinde artış gözlemlendi.

10- Tüm ADR uygulanan gruplarda Bowman ve glomerüler yumak alanlarının azaldığını, fakat ADR ile birlikte SQ-KK ve SQ-Z uygulaması ile Bowman ve glomerüler yumak alanlarındaki düşmenin, sadece ADR uygulanan gruba göre daha az olduğu görüldü.

11- Bowman ve glomerüler yumak alanlarının; kan ve idrar biyokimyasal analizleri ile ilişkilerini değerlendirdiğimizde; her iki alan ölçümü azaldıkça, idrar proteinüri değerleri ile

kan BUN ve kreatinin değerlerinde artış; idrar üre ve kreatinin değerleri ile kan total protein ve albümin değerlerinde ise azalma olduğu izlendi.

12- Glomerüler yumak alan ölçümlerinin; idrar proteinüri değerleri, tüm kan analizleri ve PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları ile korelasyon ilişkisinin, Bowman alan ölçümlerine kıyasla daha yüksek olduğunu saptandı.

13- ADR uygulanan gruplarda ortalama glomerüler WT-1 pozitif podosit sayılarında azalma olduğu izlendi. Ancak ADR uygulamasına ek olarak verilen SQ-Z ile; ortalama WT-1 değerlerinin kontrol, SQ-KK ve SQ-Z grupları ile benzer değerlerde olduğunu ve ADR+SQ-Z uygulanan gruptaki ortalama WT-1 pozitif podosit sayısının yalnızca ADR uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu bulundu. Aynı ilişki SQ-KK+ADR grubu ile ADR grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

14- Klinik ölçütler ile uyumlu olarak, idrar proteinüri ile kan kreatinin ve BUN düzeyleri arttıkça, ortalama WT1 değerlerinin anlamlı düzeyde azalma olduğu görüldü.

15- Adriyamin ile birlikte SQ-KK ve SQ-Z uygulanan gruplarda, yalnızca ADR uygulanan gruba göre tübüler hasar ve interstisyel enflamasyon bulgularının şiddetinde belirgin azalma olduğu görüldü.

16- Kontrol, SQ-KK ve SQ-Z gruplarındaki sıçanlarda interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulguları gözlenmezken, ADR+ SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarında ise ADR grubuna göre çok daha az sayıda sıçanda interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulguları gözlemlendi.

17- PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz ortalamaları ile interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulgularının varlığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı saptandı. Ayrıca segmental skleroz ölçütünden alınan en yüksek skor arttıkça, interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulgularının görülme sıklığının da arttığı görüldü.

18- ADR+SQ-KK grubuna ait iki sıçanda glomerüllerde ve arteriollerde şiddetli ve yaygın, bir sıçanda ise glomerüllerde fokal akut TMA bulguları izlendi. Ayrıca yalnız ADR uygulanan gruptaki sıçanların birinde de glomerüllerde fokal TMA bulguları saptadı.

5. TARTIŞMA

Fokal Segmental Glomerüloskleroz kronik böbrek yetmezliğine yol açtığı için tedavisi önemli bir antitedir. 2019 yılı Türk Nefroloji Derneği'nin Ulusal Uzlaşı Raporu'na göre, Türkiye'de primer glomerüler hastalıkların (PGH) ve nefrotik sendromun en sık nedenleri arasında; membranöz nefritin (MN) ardından, FSGS ikinci sırada yer almaktadır. Ancak mevcut tedaviler ile iyileşme oranları düşük olup, önemli bir oranda hastada mevcut tedaviler ile remisyon sağlanamamakta ve kullanılan tedavilerin yan etkileri fazladır.

Fokal segmental glomerüloskleroz ve diğer birçok nefrotik sendrom ile giden glomerüler hastalıkların patogenezinde temel mekanizma podosit hasarı olduğundan, bu hastalıklar için yaygın olarak kabul edilen görüş "podositopati" hipotezidir (46). Postmitotik hücreler olan podositlerin, hastalıkların başlangıcında sayılarının azalması ile birlikte glomerüler yumakları tam çevreleyememesi sonucunda, yumak ile Bowman kapsülü arasında yapışıklıklar oluşmaktadır (48). Mitoz için intrinsik bariyeri olan podositlerde proliferatif cevabın gelişmesi podositleri hasardan korumak yerine hasarı arttırıp, glomerüloskleroz oluşumuna katkıda bulunmaktadır (54-55). Yakın zamanda Bowman kapsülünün parietal epitelinde progenitör hücre popülasyonu olduğu ve viseral podositler için intrarenal progenitörler olabilecekleri keşfedilince, bölünme yeteneği olmayan podositlerde rejenerasyonun nasıl gerçekleşeceğine dair araştırmalar başlamıştır.

Günümüzde seçeneklerin kısıtlı olduğu FSGS tedavisinde, ilerleme kaydetmek amacı ile yapılan in vivo ve in vitro çalışmaların çoğu; podosit hasar mekanizmalarını aydınlatmak ve podosit hasarını önlemek/azaltmayı amaçlamaktadır.

Glukokortikoidler, patogenezi mekanizması net olarak anlaşılamamış olsa da, hala nefrotik sendromun başlangıç tedavisinde yer alan seçeneklerdendir (106). Podosit hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda, deksametazonun nefrin ve tübülün- α ifadelerini arttırdığı, normal glomerülde podositlerde sentezlenen ve MDH'da arttığı gösterilen vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) (171) ifadesini ise azalttığı; ayrıca podositlerce üretilen IL-6 ve IL-8 sitokinlerini baskıladığı gösterilmiştir (81). Deksametazonun podosit hücre iskelet elemanlarından aktin filamanlarının stabilizasyonunu sağlayarak podosit hasarını önlediği de bildirilmektedir (172). Sıçanlarda ADR ile indüklenen nefropati modeli ile yapılan çalışmalarda, hücre kültürü çalışmalarında elde edilen veriler ile uyumlu olarak ; prednison tedavisi ile proteinürinin ($p<0.01$) ve glomerüler lezyonların şiddetinin azaldığı, yarık

diyaframdaki nefrin, podosin ve CD2AP dağılımının stabilizasyonunun arttığı, VEGF ifadesinin korunduğu gözlenmiştir (173,174).

Böbrek hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörlerinin progenitör hücre aktivasyonu ve glomerüler yapının korunmasını sağlayarak renal hastalıkların ilerlemesini önlediği in vivo ve in vitro çalışmalar ile gösterilmiştir. Podositler Anjiotensin II tip 1 reseptör (AT1) ekprese eder ve Anjiotensin II intrasellüler kalsiyum düzeylerini arttırarak hücreleri depolarize eder. Yapılmış çalışmalarda Anjiotensin II'nin kan basıncı üzerine etkisinden bağımsız olarak, podosit hasarını tetiklediği ve arttırdığı, ayrıca glomerüler hasarın skleroza ilerlemesine katkı sağladığını desteklemektedir (175). Anjiotensin inhibisyonunun, podositler üzerinde ifade edilen AT1 reseptörlerinden bağımsız olarak, podositleri hasarlanmadan koruduğu ve glomerüloskleroz gelişimini azalttığı gösterilmiştir (176).

Yaş ile birlikte proteinüri ve hipertansiyon geliştiren sıçan grubu olan Munich-Wistar sıçanlar ile yapılan çalışmada (177), ACE inhibityonu ile proteinürinin anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır (172 ± 79 mg/gün'den 81 ± 23 mg/gün'e düşüş). Anti-proteinürik cevap ile bazal proteinüri değerleri arasında çok yüksek düzeyde korelasyon saptanmış olup, 10 hafta sonunda ACE inhibitörleri ile tedavi edilen grupta, glomerüler sklerotik lezyonlar anlamlı düzeyde daha az sayıda izlenmiştir ($p < 0.01$). Yine Munich-Wistar sıçanların kullanıldığı ilerleyici renal hastalık modelinde, 50 hafta boyunca süren çalışmada 10. haftadan itibaren ACE inhibitörü verilen grupta proteinürinin normal değerlere oldukça yaklaştığı ve serum kreatinin değerlerinin sabit kaldığı gözlenmiştir. Tüm glomerüler yumakların seri kesitler ile değerlendirilmesinde, tedavi almayan grubun tüm glomerüllerinde değişen oranlarda ve yaş ile şiddeti artan glomerüloskleroz izlenmiş olup, ACE inhibitörü uygulanan grupta ise glomerüloskleroz yaygınlık ve şiddetinin azaldığı bulunmuştur (Tedavi alan grupta %23 glomerülde skleroz bulgusu izlenmemiştir). Glomerüler hacim ise tedavi ile anlamlı düzeyde değişmemekle birlikte, tedavi ile glomerüllerin sklerotik olmayan bölümlerinin boyutunun arttığı (%46,9'dan %65,5'e artış) gözlenmiştir. Bu bulgular ile ACE inhibitörlerinin renal hasarı durdurmasına ek olarak, glomerüler dokuda rejenerasyon da yaptığı savunulmaktadır (178). Ayrıca ACE inhibitörleri ile yapılan deneysel çalışmada, ACE inhibitörleri ile tedavi edilen grupta glomerül başına düşen WT-1 pozitif podosit sayısında bazal değerlerin de üstüne çıkan artış saptanmış olması, ACE inhibitörlerinin podosit

popölasyonunu yenileyerek de, glomerölör kapiller yapının düzelmesine katkıda bulunabileceği belirtilmektedir (179).

Transplantasyon sonrası yaklaşık %30-40 hastada FSGS tekrarlamakta ve graft yaşam süresini azaltmaktadır. Yüksek riskli hastalarda ise rekürrens sıklığı %86'lara kadar çıkmaktadır (180). Rituximab B lenfositlerde ifade edilen CD20 monoklonal antikorudur ve akut allograft rejeksiyonu ve steroid dirençli nefrotik sendrom gibi nefrolojik durumlarda tedavi seçenekleri arasındadır (181). Rituximab ayrıca glomerölörlerdeki podositler üzerinde ifade edilen sfingomiyelin-fosfodiesteraz asit benzeri 3b proteine (sphingomyelin-phosphodiesterase-acid-like-3b (SMPDL-3b)) bağlanarak asit-sfingomiyelinaz aktivitesini (ASMaz) düzenlemektedir. Sfingomiyelin-fosfodiesteraz asit benzeri 3b proteini podosit ayaksı çıkıntılarda yer alan ve aktin iskeleti ile ilişkili protein olup, aktin iskeletinin yeniden düzenlenmesinde görev almaktadır. Rituximab tedavisinin transplant sonrası tekrarlayan FSGS hastalarında podositlerde izlenen SMPDL-3b ve ASMaz seviyelerindeki düşmeyi önlediği, in vitro olarak podositlerdeki aktin iskeletinin ayrışmasını ve podosit apoptozisini azalttığı saptanmıştır (182). Wistar sıçanlarda tek doz intravenöz ADR ile indüklenen nefropati modelinde, haftalık Rituximab uygulamasının böbrek işlevleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla, 28. günde sakrifiye edilen sıçanlarda proteinüri, SMPDL-3b proteininin glomerölörleri ve immunfloresan boyama prosedürü ile podositlerde ifade edilen nefrin, podosin proteinleri değerlendirilmiştir. Rituximab uygulamasının, podositler üzerindeki SMPDL-3b ifadelerini arttırarak podositleri hasardan koruduğu, podosit ilişkili podosit ve nefrin protein düzeylerindeki düşmeyi ve idrar proteinüri değerlerini ($p<0.001$) azalttığı gösterilmiştir (134).

Rekombinan eritropoetin kullanımının, apoptotik hücre ölümünü azaltarak ve peritübölör kapilleri koruyarak, ADR ile uyarılan renal hasardan koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (183). Vitamin E'nin, sıçanlarda çeşitli dokularda ADR'nin oluşturduğu hasar bulgularına olan önleyici etkilerini araştıran çalışmada, 4 hafta boyunca haftalık 2mg/kg doz ile i.p yoldan ADR uygulanmış, iki gruba ek olarak her gün 150 ve 500mg/kg dozlarında oral olarak E vitamini uygulanmıştır. Deney sonunda böbreklerde makroskopik patoloji saptanmamış olup, vitamin E uygulaması ile tübölör hasar bulguları azalmıştır (184).

Nikotinamid (NAD) ile doksorubisinin nefrotoksik bulgularına olan etkilerini araştıran çalışmada; 20 mg/kg İp yol ile uygulanan ADR ile birlikte 200 mg/kg dozunda İp yoldan NAD uygulanan Wistar sıçanlar 10. günde sakrifiye edilerek böbrek dokularında ışık mikroskopik hasar bulguları ile doku CAT, GSH ve GPx düzeyleri değerlendirilmiştir.

Nikotinamid + ADR uygulanan grupta doku i-NOS ve endotelial NOS (e-NOS) seviyelerinde doku düzeyinde immünohistokimyasal boyanma miktarında azalma, glomerüller ve tübüller hasar bulgularında ise nikotinamid uygulanan grupta azalma olduğu bildirilmiştir (185).

Rosuvastatin uygulaması ile, podosit hücre kültüründe ADR ile artış saptanan podosit hücrelerindeki apoptozis miktarında, p21 bağımlı anti-apoptotik yolak aktivasyonu ile %54 düzeyinde azalma olduğu ($p<0.005$) belirtilmektedir (186).

İn vitro sıçan ve fare podosit hücre kültürlerinde All trans retinoik asit (ATRA) uygulaması ile podosit ayaksı çıkıntılarının oluşumunun uyarıldığı, apoptozisin azaldığı ve nefrin ile podosit ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir (187). Bu bulgular eşliğinde tasarlanan in vivo FSGS modelinde; C57BL6 farelere, koyun anti-glomerüller antikoruna ile (0.3 ml/20 g – 2 gün uygulama ile) uygulanmış, 3. günde rastgele seçilen 10 adet fareye 16.6 mg/kg dozunda İp yoldan günlük ATRA, kalan farelere ise mısır yağı verilmiştir. Farelerden 5 tanesi 7. günde, kalanı 14. günde idrar örnekleri toplandıktan sonra sakrifiye edilerek ATRA uygulamasının erken ve geç etkileri araştırılmıştır. All trans retinoik asit (ATRA) uygulaması ile anti-glomerüller antikor uygulanan farelerde 7 ve 14. gün idrar proteinüri düzeylerinde, sadece anti-glomerüller antikor uygulanan farelere oranla anlamlı düzeyde azalma saptanmıştır ($p<0.01$). Serum BUN seviyelerinde ise ATRA uygulaması ile değişiklik gözlenmemiştir. Podosit belirteçlerinden sinaptopodin, podosit ve nefrin proteinlerinin immünohistokimyasal ifadelerinin ATRA uygulanan grupta, FSGS grubuna göre daha az azaldığı; diferansiye podosit protein belirteci olan WT-1 ifadelerinin de FSGS grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (187). Yine aynı grubun yaptığı ek çalışmada, ayrıca ATRA uygulaması ile deneysel FSGS modelinde; podosit progenitörleri olduğu düşünülen, parietal epitel hücre belirteci PAX-2 ve podosit hücre belirteci WT-1 proteinlerini birlikte ifade eden glomerüller geçiş hücrelerinin; Bowman kapsülü ve glomerüller yumak boyunca sayılarında anlamlı düzeyde artış olduğu gösterilmiştir (73).

Podosit hücre kültüründe ve diyabetik hastalara ait böbrek biyopsilerinin parafin blokları ile yapılan analizlerde; yüksek doz glikoz ile uyarılan podosit hasarı sonucu sinaptopodin, podosit ve TGF- β süper ailesi üyelerinden kemik morfogenetik protein-7 (Bone morfogenetik protein-7 (BMP-7)) seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Dışarıdan rekombinan BMP-7 uygulaması ile podositlerdeki, sinaptopodin ve podosit proteinleri ile mRNA düzeyleri; gerçek zamanlı PCR, Western blot ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak analiz edilmiş ve tüm ölçütlerin düzeylerinde artış saptanmıştır (180).

Streptozosin ve 5/6 nefrektomi ile oluşturulan DM ve HT (birlikte ve ayrı ayrı) hayvan modellerinde, antioksidan işlevi bilinen lipoik asit ile tedavi edilen gruplarda Bowman kapsül kalınlığı, glomerüler çap, interstisyel fibrozis, mezengial matriks artışı, renal skar, kan BUN ve kreatinin değerlerinde anlamlı düşme olduğu gözlenmiştir (80).

Membranöz nefropati hastalarında adrenokortikotropik hormon (ACTH) tedavisi proteinürinin azaldığı gözlenince (189) etki mekanizması ile ilgili araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Adrenokortikotropik hormon (ACTH) endojen peptid hormon olup, vücutta yaygın olarak dağılan, bir-beş arası numaralı melanokortin reseptörleri (MC1R-MC5R) aracılığı ile etki göstermektedir. Araştırmalarda böbrek dokusunda (podositler, glomerüler endotelyal hücreler, mezengial hücreler ve tübül epitel hücreleri) en fazla MCR1 protein ifadesi olduğu gösterilmiştir. Podosit hücrelerinde MCR1 proteininin sinaptopodin ile komşuluğu olduğu ve MCR1 agonistlerinin Heyman nefrit modeli oluşturulan sıçanlarda proteinüriyi anlamlı olarak azalttığı ($p<0.001$), elektron mikroskopik olarak glomerüler morfolojide iyileşme yaptığı ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (190). Tümör nekroz faktör (TNF-) aracılı akut böbrek hasarı modeli oluşturulan sıçanlarda, ACTH uygulaması ile akut tubuler nekroz bulgularının şiddetinde azalma olduğu, tübül epitel hücrelerinde apoptotik hücre sayısında azalma olduğu saptanmıştır (191).

N-asetin sistein (NAC)'in böbrek hasarı üzerine etkilerini araştıran çalışmada, intravenöz yoldan 1. gün 4,5 mg/kg ve 7. günde 2 mg/kg dozlarında uygulanan ADR ile oluşturulan nefropati modelinde N-asetin sistein (NAC) günlük 150 mg/kg dozunda oral gavaj ile uygulanarak böbrek hasarı üzerine etkisi araştırılmıştır. 14. günde denekler sakrifiye edilerek, böbrek dokularında gerçek zamanlı (Real-time) PCR ile Toll benzeri reseptör-4 (TLR-4) mRNA düzeyleri, ELISA ile ise TNF- α , IL-6, and IL-1 β ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. NAC uygulanan grupların böbrek dokularında TNF- α , IL-6, IL-1 β sitokinleri ile TLR-4 mRNA ifadelerinde anlamlı düzeyde düşme ($p<0.05$) saptanmıştır. Ayrıca NAC uygulanan grubun idrar proteinüri değerleri, kontrol grubuna göre daha fazla olmakla birlikte; NAC uygulanmayan NS grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p<0.05$) (192).

Heparinin Wistar sıçanlarda ADR ile uyarılan (3,5 mg/kg) böbrek hasarı üzerine etkisini araştıran çalışmada, heparin ile tedavi edilen sıçanlarda glomerüler lezyonların yoğunluğunda ($p<0.05$) ve idrar albüminüri düzeylerinde azalma ($p<0.05$) saptanırken, tubulointerstisyel hasar bulgularında anlamlı değişiklik gözlenmemiştir (193). Düşük molekül ağırlıklı

heparinin, Wistar sıçanlarda ADR ile uyarılan (7,5 mg/kg) böbrek hasarı modelinde; üriner protein/kreatinin oranları ile serum albümin, ürik asit ve üre düzeylerinde kontrol grubu ile benzer değerler bulunmuştur ($p<0.001$) (194). Bütün bu araştırmalara rağmen ilerleyici bir hastalık olan FSGS, son dönem böbrek yetmezliği nedenleri arasındaki yerini korumaktadır ve daha iyi tedavi seçeneklerine gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle kanser ve diğer hastalıklarda koruyucu ve önleyici etkisi olan ve ülkemizde önemli bir üreticisi olduğu skualenin segmental skleroz üzerine etkisinin araştırılması düşünülmüştür.

Skualen ile yapılan araştırmalara gelirse; değişik çalışmalarda özellikle kanser ve diğer hastalıklardaki koruyucu ve önleyici etkilerinin olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarda skualenin antioksidan ve antitümör etkileri ön plana çıkmaktadır. Araştırmaların bir kısmı in vitro, bir kısmı in vivo deneysel araştırma özelliğinde olup; antioksidan araştırmalar arasında ülseratif kolit, miyokard infarktüsü, Parkinson hastalığı, ilaç ve radyoterapi yan etkileri üzerinde etkinliği bulunmaktadır. Tümör karşıtı etkileri ise kolon, akciğer, meme, nöroblastom, deri kökenli skuamöz hücreli karsinom alanlarında araştırılmıştır (11).

Skualenin antioksidan etkilerini araştıran çalışmalarına değinecek olursak; antioksidan etki, Warleta ve arkadaşlarının araştırmasında ölümsüz insan meme epitelyal hücreleri, minimal invaziv (östrojen ve progesteron reseptörleri pozitif) ve yüksek dereceli invaziv (östrojen ve progesteron reseptörleri negatif) meme karsinomu hücre hatları kullanılarak araştırılmıştır (119). Araştırmada ölümsüz tümörojenik olmayan insan meme epitel hücre hattında (MCF10A) doz bağımlı olarak, intraselüler ROS (Reaktif oksijen deriveleri) seviyelerini azalttığı, H₂O₂ ile indüklenen oksidatif hasarı önlediği ve DNA hasarında anlamlı bir azalma yaparak hücreleri koruduğu bulunmuştur. Radikal oluşumunu önleyici aktivitesinin araştırıldığı yöntemlerde kontrol olarak antioksidan etkisi bilinen α -takoferol (TOC) ve 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2- karboksilik asit (Trolox) kullanılmış, skualenin radikal önleyici etkisinin 800 mM'den sonra başladığı bulunmuştur.

Diyetle alınan skualenin İBH üzerine etkisini araştıran deneysel çalışmada, DSS (dekstran sülfat sodyum) ile akut kolit modeli oluşturulmuş, C57BL/ 6 fareler üzerinde yapılan çalışmada, skualenin inflamasyonu azaltıcı etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada inflamatuvar mediyatörler; TNF- α ve IL1- β , ELİSA ile ölçülmüş, siklooksijenaz-2 (COX- 2) ve indüklenabilir nitrik oksit sentetaz (i- NOS) protein ifadesi western blot ile değerlendirilmiştir. Fareler plasebo, kontrol, %0,1'lik ve %0,02'lik skualen ile beslenmelerine göre 4 gruba ayrılmış, 4 haftalık diyetten sonra plasebo grubu dışında 5 gün boyunca %3'lük

DSS içme sularına karıştırılarak içirilmiş ve 5 gün daha diyetle devam edilip kurbanı verilmiştir. Buna göre skualen verilen yapılan gruplarda proksimal kolon ve rektumda mikroskopik hasar skoru anlamlı olarak daha düşük saptanmış, ELISA ile ölçülen mukozal sitokin (TNF- α ve IL- β 1) immün sinyallerinde anlamlı olarak azalma bulunmuştur (120).

Kanser kemoterapisinin yan etkilerine karşı skualenin koruyucu etkisi çalışılmıştır. Bu potansiyel etkiyi araştırmak için skualenin koruyucu etkisi, kemik iliği hücrelerinde ve nöroblastom hücre hatlarında sisplatin ile uyarılmış toksisitede araştırılmış ve sisplatin toksisitesine karşı etkisi bilinen bir hücre koruyucu ajan olan glutatyon (GSH) ile karşılaştırılmıştır (116). Koloni Faktör Birimi (CFU-colony factor unit) testi hematopoetik progenitor hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerini ölçen bir test olup, bu test ile ölçümlerde skualenin doz bağımlı olarak hematopoetik kolonilerin sayısını arttırdığı, koloni uyarıcı etkisinin 12.5–25 mM doz aralığında en yüksek düzeyde olduğu izlenmiştir (117). Skualen (25 mM) koloni büyümesini tek başına sisplatinin 2 mM ve 4 mM doz kullanıldığı gruba göre sırasıyla tüm koloni tiplerinde CFU-GEMM (granülosit, eritrosit, monosit, megakaryosit) ve CFU-GM (granülosit, monosit) sırasıyla %62 ve %32 oranında arttırmıştır ($p=0.042$). Skualen ve GSH'nun protektif etkilerinin karşılaştırılmasında ise skualenin 25 mM'lik dozunun GSH'nun 200 mM'lik dozuna eşdeğer olduğu ve sisplatinin 0.1- 4 mM'lik doz aralığında etkili oldukları gözlenmiştir (117). Skualenin kemik iliği mikroçevresinde bulunan mezenkimal kök hücrelerinin karakteristik özelliklerine sahip CFU-fibroblast (CFU-F) kolonilerini platinlerin toksisitesine karşı koruduğu gözlenmiştir. Platin bileşikler ayrıca, kemik iliği ve böbrek gibi dokularda ilk uygulamadan sonra 6 aya kadar kalabilen ve kronik toksik etkiler yapabilen bileşiklerdir. Ek olarak sisplatinin kronik etkileri üzerine de, skualenin koruyucu etkisinin in vitro düzeyde araştırıldığı bu çalışmada 4 haftalık CFU-GEMM kolonilerinde köpük hücreleri (lipid yüklü vakuoller olan makrofajlar) sayılmış ve tek başına sisplatin kullanılan grupta köpüksü makrofajların 5 kat daha fazla olduğu, bunların sayısının GSH ve skualenin kullanıldığı gruplarda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (117).

Sisplatinin toksik etkisi üzerine skualenin etkisinin in vivo olarak araştırıldığı çalışmada, farelere tümör inokülasyonundan 5 hafta sonra, haftalık sisplatin veya karboplatin tedavisine başlanmış ve her platin uygulamasından 3 saat önce de 100 mg/kg dozunda İp yoldan skualen uygulanmıştır. Skualen kombinasyonun kullanıldığı gruplarda, kilo kaybının anlamlı ölçüde daha az olduğu, sisplatin tedavisine bağlı olarak deride oluşan keratin plaklarında anlamlı düzeyde azalma saptanmıştır. Ayrıca in vitro çalışmada bulunan sonuçlar

ile paralel olarak, CFU-GM ve CFU-F kolonilerinin sayısındaki düşmeyi ve kemik iliği hücrelerinde ROS seviyelerindeki düşmeyi anlamlı düzeyde azalttığı, GSH seviyelerini ise arttırdığı bulunmuştur (118). Platinler dışında, skualenin hekzaklorbifenil, hekzoklorbenzen, arsenik, teofilin, fenobarbital ve striknin gibi çeşitli kimyasal ajanlara karşı da detoksifikasyon aktivitesi deneysel modeller ile gösterilmiştir (114-115).

Skualenin isoproterenol ile indüklenen miyokard infarktüsü üzerine etkisini araştıran deneysel modelde; 45 gün boyunca öğünlerinde %2 lik skualen ile beslenen sıçanlarda, 45. gün sonunda intraperitoneal isoproterenol 2 gün boyunca günde tek doz şeklinde enjekte edilmiş ve 2 günün sonunda sıçanlar kurban edilerek miyokardial dokuda ve kanda lipid peroksidleri, glutatyon seviyesi ve antioksidan enzim seviyeleri ölçülmüştür. İsooproterenol uygulaması öncesi skualen verilen sıçanlarda, lipid peroksidasyonunun etkisinin azaldığı ve GSH seviyelerini korunduğu gözlenmiştir. Ayrıca glutatyon bağımlı antioksidan enzimler (Glutatyon peroksidaz (GPX) ve Glutatyon-S Transferaz (GST)) ve antioksidatif enzimlerin (Katalaz ve Süperoksit dismutaz (SOD)) seviyelerinin skualen uygulanması ile korunduğu bulunmuştur (127).

Skualenin radyasyonun toksik etkilerine karşı, etkinliğini araştıran deneysel çalışmada, 14 gün boyunca %2'lik skualen ile beslenen fareler 14. gün sonunda tüm vücut radyasyonuna maruz bırakılmış ve hayvanların ağırlıkları, total beyaz küre ve lenfosit seviyeleri, jejunal villus hücrelerinin nükleer alanları, intestinal mukoza ve plazmada skualen seviyeleri ve hayvanların yaşam süreleri araştırılmıştır. Skualen uygulanan grup ve kontrol gruplarında apikal villüs nükleer alanı, radyasyona maruz kalmayan grupta, maruz kalan gruba göre, anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Radyasyona maruz bırakılan gruplar arasında, skualen uygulanan grupta nükleer alanın anlamlı derece fazla olduğu görülmüş olup, global analizde skualen uygulamasının daha uzun sağkalım için belirleyici bir faktör olduğu saptanmıştır ($p=0.0054$) (128).

Skualenin kanser çalışmalarında kullanıldığı araştırmalar, *kolon*, *deri*, *akciğer* ile ilişkili olup tümü deneysel araştırma niteliğindedir. Azoksimetan ile indüklenmiş kolonda aberran kriptik fokus (ACF) deneysel hayvan modelinde %1 içerikli skualen diyeti uygulanmış erkek sıçanlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında total ACF/ kolon sayısında ve her alandaki aberrant kript çok odaklılığında anlamlı bir azalma saptanmıştır (195).

Smith ve arkadaşlarının (196), diyetel zeytinyağı ve skualenin farelerde akciğer tümörögenез üzerine etkisini araştıran çalışmada, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-

butanon (NNK) (103 mg/kg, i.p.) ile akciğer tümörogenezi indüklenmiş ve gruplar %5'lik mısır yağı (kontrol), %19,6 zeytinyağı ve %2'lik skualen ile beslenmelerine göre karşılaştırılmıştır. Diyetel zeytinyağı ve skualen uygulaması tümör insidansı üzerine anlamlı bir etki yaratmamakla birlikte, çok odaklılığını ve hacmini anlamlı bir şekilde ($p<0,05$) azaltmıştır (zeytinyağı ile %46- 58, SQ ile %33-47). Bu sonuçlar zeytinyağı ve skualenin akciğer tümörlerinin gelişimini ve büyümesini azalttığını desteklemiştir. Histopatolojik analizlerde skualenin akciğer hiperplazisini (%70), zeytinyağı ve skualenin akciğerde adenom formasyonunu (%34 ve %52) anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür.

Kimyasal olarak indüklenen deri kanseri deneysel modelinde, 50 dişi farede deri tümörü oluşumu uyarılarak devam ettirilmiştir. Farelerin her bir grubu mineral yağı, %5'lik SQ ve Roideks (SQ, A vitamini, E vitamini ve aloe-veradan oluşan formülasyon) ile tedavi edilmişlerdir. Tümörojenik kimyasal maddenin uygulamasından 13 hafta sonra tümör insidansları mineral yağı, skualen ve roideks için sırası ile %33, %27 ve %20 olarak gözlenmiştir (197).

In vitro ve in vivo araştırmalarsa skualenin tümör inhibisyonundaki rolünün, β -hidroksil- β metilglutaril CoA redüktaz aktivitesi üzerindeki güçlü baskılayıcı etkisine bağlı olarak, ras onkogeninin prenilasyonunu sağlayan farnezil pirofosfat seviyelerinde azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir (129,198).

Skualenin ön planda antioksidan etkinliği göz önüne alınarak, çalışmamızda adriyaminin ile FSGS oluşturulan sıçanlarda köpek balığı ve ülkemizin de çok önemli üretici konumunda olduğu zeytinyağı kaynaklı bitkisel skualen formlarının etkisi araştırılmıştır. Literatürdeki mevcut çalışmalar genelde uluslararası düzeyde firma sağlayıcısı olan köpek balığı karaciğeri kaynaklı skualen ile yapılmıştır. Çalışmamızda hem köpek balığı hem zeytinyağı kaynaklı skualen grupları oluşturmamızın nedeni; literatürdeki mevcut yayınlarda İspanya ve İtalya kökenli bazı çalışmalar haricinde, köpekbalığı karaciğeri kaynaklı skualen kullanılmış olması nedeni ile, sadece Akdeniz iklimine sahip bölgelerde endemik olarak yetişebilen ve kültürel miras olarak kabul edilen zeytinyağı kaynaklı bitkisel skualenin etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırabilmektir. Çalışmamızda kullandığımız SQ-Z'nin saflık oranı %96,56 olup, eser miktarda zeytinyağının içeriğinde bulunan diğer bileşikleri de içermektedir. Podosit hasarına olası önleyici etkisini gösterdiğimizize, zeytinyağı ve bağlantılı olarak skualen üretiminde başı çeken ülkelere bir konumunda olan Türkiye için önemli bir veri ve destek sağlayabilmek amaçlarımız arasında yer almaktadır.

Bu amaçlarla deneysel gruplarımızı başlangıç 300-350 gr arasında Wistar sıçanlardan oluşan; kontrol grubu, tek başına ADR uyguladığımız grup, tek başına SQ-Z ve SQ-KK uyguladığımız gruplar ile ADR ile birlikte SQ-Z ve ADR ile birlikte SQ-KK uyguladığımız gruplar olmak üzere altı adet deneysel grup oluşturduk. Çalışmalarda skualenin genel olarak oral gavaj yolu veya hayvanların sularına karışım yolu ile uygulandığını saptadık. Biz de çalışmamızda doz ayarlamasının daha güvenilir olduğunu düşündüğümüz için direkt oral gavaj yolu ile uygulamayı seçtik. Literatürde değişen dozlarda oral skualen uygulamasının (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1 ml/gün), çeşitli dokularda siklofosamid toksisitesi üzerine etkisi araştırılmış ve serum doku hasar enzim seviyeleri göz önüne alınarak, en yüksek koruyucu etkinlik; minimum 0.4 ml/gün uygulama olarak saptanmıştır (186,187). Bu nedenle çalışmamızda da, literatürde uygulandığı şekilde adriyaminin uygulamasından 1 hafta önce başlanarak 14 gün süreyle, her gün oral gavaj yolu ile 0.4 ml/sıçan olacak şekilde skualen oral gavaj yolu ile uygulandı (151).

Adriyaminin (ADR, doksurubisin) deneysel FSGS modeli oluşturmak için sıklıkla deneysel çalışmalarda kullanılan bir antineoplastik antibiyotik olup, birçok çalışmada değişen sıklık ve dozlarda uygulandığı görülmektedir. Uygulanan doz ve sıklığa göre semptom, patolojik bulgular ve deney sürelerinde değişiklikler bulunmaktadır (132,133). Çalışmalarda ADR 5, 7.5,10 veya 15 mg/kg olarak kuyruk veninden tek doz verildikten yaklaşık 2 hafta sonra sıçanlarda proteinüri, hipoalbuminemi, hiperlipidemi, hiperkoagülabilite, ödem olduğu bildirilmektedir (134,135). Biz de mevcut çalışmamızda FSGS modeli oluşturmak amacı ile ADR tek doz intravenöz kuyruk veninden uygulama yapmayı uygun gördük. Yaptığımız pilot çalışmada, 10 mg/kg dozunda kullandığımız ADR ile sıçanlarda yan etkilerin şiddetli olması ve erken kayıpların yaşanması nedenleri ile deneysel modelimizde 7,5 mg/kg dozunda ADR kullanmaya karar verdik.

Deneklerin adriyaminin etkisi altında ağırlık kayıpları ve idrar çıkışında artış ADR nefropatisinde görülen bulgulardır. Deepa 7,5 mg/kg adriyaminin enjeksiyonu ile sıçanlarda oluşturduğu nefropati modelinde iki haftanın sonunda adriyaminin alanlarda kontrol grubuna göre anlamlı ağırlık kaybının olduğunu (201), Javaid ve ark. Adriyaminin nefropatisi oluşturdukları sıçanlarda 24 saatlik idrar miktarlarında artış olduğunu saptamışlardır (202). Literatürde sıçanlara, bizim çalışmamızda da uyguladığımız şekilde tek doz 7,5 mg/kg adriyaminin intravenöz uygulamasından sonra 5-10. günlerde idrar çıkışında artış olduğu, oligüri izlenmediği saptanmıştır (135). Zima ve arkadaşlarının (203) yaptığı deneysel

çalışmada 5 mg/kg adriyamisin enjeksiyonu ile 3 haftada nefrotik sendrom oluşturulmuştur. Bertani ve arkadaşları çalışmalarında sıçanlarda adriyamisin ile oluşturulan nefrotik sendromda, tek doz intravenöz 7.5 mg/kg dozunda ADR uygulaması ardından 4-5. günde proteinürinin başladığını, tam gelişmiş nefrotik sendromun ise 13-15 gün sonra oluştuğunu söylemektedir (136). Üç haftanın sonunda adriyamisin alan sıçanların serum kreatinin değerlerinde değişiklik gözlenmemiştir. El-Shitany ve arkadaşları sıçanlarda 10 mg/kg ADR ile yaptıkları nefropatide 30. gün kreatinin düzeyleri yaklaşık iki katından fazla artış göstermiştir (145). Ajith 15 mg/kg adriyamisinle oluşturduğu glomerülotoksisite modelinde ise, üç günde böbrek fonksiyonlarında bozulma olduğunu belirtmektedir (204). Wang araştırmasında 7,5 mg/kg dozunda adriyamisin ile yapılan nefropati modelinde dört hafta sonra sıçanların kreatinin klirenslerinde anlamlı azalma, serum kreatinin değerlerinde ise artma saptamıştır (138). Deepa araştırmasında 7,5 mg/kg adriyamisin ile oluşturduğu nefropati modelinde kan üre değerlerini adriyamisin alanlarda 15. gün yüksek saptamıştır (194). Adriyamisinin enjeksiyonundan sonra doz ve uygulama sıklığına göre değişebilen günlerde proteinüri görülmesi beklenen bulgudur ve genelde çalışmalarda 14. günde oluştuğu gözlenmiştir (134,135,205).

Biz de çalışmamızda, deney süresinde gruplarda oluşan ağırlık değişimlerini, yem ve su tüketimlerini, idrar miktarlarını takip ederek; ADR ile meydana gelen böbrek hasarı ve nefrotik sendrom bulgularını biyokimyasal olarak kan (total protein, albümin, BUN) ve idrar ölçütleri (14 ve 22.günlerde 24 saatlik idrarda; üre kreatinin, protein) ile analiz ettik ve SQ uygulamasının böbrek hasarını azaltacağı hipotezimize dayanarak bu ölçütlerde değişimler gözlemlemeyi hedefledik.

Bertani ve arkadaşları sıçanlarda ADR ile oluşturdukları nefropati modelinde, 13. günde ayaksız çıkıntılarda düzleşme ve kayıp izlenmiş, bulguların 28. günde ise yaygın boyuta ulaştığını saptamıştır (136). Wang'ın çalışmasında 7,5mg/kg dozunda ADR uygulaması ile dört haftada glomerüllerin %39'unda glomerüloskleroz, tübül çapında artış, tübül hücrelerinde yükseklik kaybı, tübüler atrofi oluşmuştur (138). Ji'nin çalışmasında tek taraflı nefrektomi sonrası 6 mg/kg adriyamisinle fokal segmental glomerüloskleroz, kapiller yatakta obstrüksiyon, tübüler epitelde dejenerasyon, interstisyel fibrozisin dört haftada oluştuğu belirtilmiştir (206). Sıçanlarda adriyamisinin 5 mg/kg dozunda verilmesi ile 10 haftada glomerüler skleroz geliştiği, 28 haftada ise 10. haftadan üç kat fazla lezyonun oluştuğu bildirilmektedir (139). Adriyamisin uygulaması ile sıçanlarda interstisyel enflamasyon ve

tübüler hasar bulguları literatürde izlenen değişikliklerdendir (207). İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulguları genelde birbirine eşlik eden bulgular olup, glomerüler segmental skleroz alanlarında görülme sıklıkları fazladır. Fokal tübüler atrofi bulguları izlenen, fakat glomerüler lezyon izlenmeyen biyopsilerde seri kesitlerle segmental sklerotik glomerül saptanabileceği ve bu nedenle fokal tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis varlığının uyarıcı olduğu da bilinmektedir (208). Ayrıca interstisyel fibrozis şiddetinin hastalığın gidişini belirlemede önemli belirleyici faktörlerden biri olduğu bildirilmektedir (111). Çalışmamızda da fokal segmental skleroz ve eşlik edebilecek diğer renal hasarlanma bulgularını histopatolojik olarak değerlendirmek üzere; gruplara ait böbrek dokularında, PAS ve PAMS histokimyasal boyalı kesitlerdeki tüm glomerüller değerlendirilerek, glomerüler segmental skleroz skor ortalamaları, en yüksek segmental skor değerleri, tübüler atrofi, interstisyel fibrozis, interstisyel enflamasyon, tübüler hasar bulgularını ve şiddetlerini saptadık.

Günümüzde insan biyopsi materyallerinde ve deneysel modellerde podosit hasarı ve podosit sayısındaki azalmanın glomerüloskleroz gelişiminde önemli rol oynadığı ve FSGS ve diğer birçok glomerulonefritte podosit hasarının temel patogenetik mekanizma olduğuna dair birçok kanıt bulunmaktadır. Podosit nükleusları WT-1 ile pozitif boyanırken, endotelial ve mezengial hücreler WT-1 negatiftir (209). Silja ve arkadaşları WT-1'in farklılaşmış, matür ve normal podositleri göstermek için ideal belirteç olduğunu belirtmektedir (210). Bryan L. Wharram ve arkadaşları da yaptığı araştırmada WT-1 ile podosit sayımının geçerli bir metot olduğunu ve podosit hasarına neden olan etiyolojilerde WT-1 pozitif podosit sayısında azalma olduğunu desteklemiştir (52). Biz de çalışmamızda SQ uygulamasının podosit hasarı/azalmasına olan etkisini araştırmak amacıyla, WT-1 immünohistokimyasal boyası ile glomerüler pozitif podosit hücre sayısı ortalamaları ile glomerüler en yüksek ve en düşük WT-1 pozitif değerleri saptadık.

Yapılan histomorfometrik kantitatif çalışmalarda erken dönem FSGS lezyonlarında ve FSGS tanılı böbrek biyopsilerindeki sklerotik olmayan glomerüllerde, glomerüler hipertrofi ve mezengial matriks artışına bağlı olarak, glomerüler alan değerlerinin arttığı bildirilmektedir (211). Siklosporin gibi immünmodülatör ajanların uygulanması ile sıçanlarda renal hasara sekonder glomerüler hipertrofi beklenmesine rağmen, glomerüler alanlarda azalma saptanmıştır (154). Biz de araştırmamızda, morfometrik olarak Bowman kapsül alan ve glomerüler yumak alan ölçümlerini yaparak, deneysel gruplarda alan ölçümlerindeki değişimleri değerlendirdik.

Çalışmanın başlangıcında vasküler yapılarda; siklosporin toksisitesinde izlenebilen ve arterioller duvar boyunca, vasküler lümeni daraltacak veya tıkayacak şekilde PAS pozitif materyal birikimi veya intimada mukoid kalınlaşma olarak tanımlanan lezyonları (162) değerlendirmeyi planladık. Ancak ADR ile birlikte SQ-KK uygulanan grupta glomerüller ve arteriollerde izlediğimiz yaygın akut TMA bulguları nedeniyle, diğer gruplar için de TMA bulgularını histopatolojik değerlendirme kategorileri arasına yer aldık. Değerlendirmeye aldığımız tüm ölçütler için, zeytinyağı ve köpekbalığı kaynaklı SQ uygulaması arasında, farklılık olup olmadığını da ayrıca değerlendirdik.

Çalışmamızdaki sonuçları ele aldığımızda; deney başlangıcında her altı grupta 300-350 gr arasında ağırlıkları olan sıçanlarda, ADR uygulanan üç grupta da 48. saatten itibaren deney sonuna kadar ağırlık kayıpları izlendi. Kontrol grubundaki sağlıklı hayvanların ağırlıkları ise deney sonuna kadar artış gösterdi. Köpekbalığı ve zeytinyağı kaynaklı SQ uygulanan gruplarda ise 96. saat ölçümlerine kadar izlenen ağırlık kaybı oral gavaj yolu ile uygulanan SQ solüsyonunun sıçanların oral ve farengeal bölgelerinde neden olmuş olabileceği doku tahribatına bağlandı. Oral gavaj uygulamasına tolerans gelişimi ve 1 hafta sonunda uygulamanın sona erdirilmesi ile ağırlık artışları kontrol grubu ile benzer eğride seyrederken, sonrasında ise deney sonuna kadar düzenli ağırlık artışı izlendi. Adriyaminin nefropatisi oluşturulan deneklerin ağırlık kaybından; idrar çıkış miktarlarındaki artış, eşlik eden metabolik bozukluklar ve beslenmelerinin bozulmasının sorumlu olabileceği düşünüldü.

Grupların yem ve su tüketimlerini değerlendirecek olursak; ADR ile ADR+SQ-KK gruplarının yem tüketimi 48. Saatte diğer gruplara göre daha düşük saptandı. 96. Saatte ise ADR uygulanan tüm grupların yem tüketimlerinde diğer gruplara göre düşüş olduğu izlendi. 7. günde ADR-SQ-Z grubunun yem tüketimi kontrol, SQ-Z ve SQ-KK grupları ile benzer, sonraki ölçümlerde ise ADR ve ADR +SQ-KK gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. ADR+SQ-KK grubundaki yem tüketiminin son ölçümlerde ADR+SQ-Z grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük saptanmasının nedeni olarak, ADR+SQ-KK grubunda gözlenen akut TMA bulgularına bağlı olabileceği düşünüldü. Yem tüketimlerinde kontrol grubunun yem tüketimi daha fazla olmasına rağmen, bazı günlere ait sonuçlarda istatistiksel olarak fark saptanamamasının nedeni olarak, kontrol grubundaki denek sayısının diğer gruplara göre daha az sayıda olması kabul edildi. Adriyaminin uygulanan grupların tümünde, 48. Saat, 96. Saat, 7. gün, 10. gün ve 14. gündeki sıvı tüketiminin diğer gruplara göre daha az olduğu izlendi. ADR, ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarında ağırlık kaybı,

kontrol, SQ-KK ve SQ-Z gruplarında ise ağırlık artımı olduğundan, kilo başına alınan sıvı miktarları değerlendirildiğinde; ADR, ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarında kilo başına sıvı alımı miktarının daha fazla olduğu görüldü.

Adriyaminin enjeksiyonundan sonra 14. ve 22. günlerde ölçülen idrar miktarları, ADR uygulanan gruptaki sıçanlarda, diğer gruplara göre 22. günde daha belirgin olmak üzere daha fazla olmasına rağmen, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. İstatistiksel olarak fark saptanmamasının, kontrol grubundaki denek sayısının diğer gruplara göre daha az sayıda olması nedeniyle olduğu düşünüldü.

Biyokimyasal kan analiz sonuçlarını değerlendirdiğimizde, ADR uygulanan üç grupta da serum kreatinin değerlerinde 22. günde yükseklik görülmesine rağmen; en yüksek değerlerin ADR grubuna ait olduğu gözlemlendi. ADR grubu ile SQ-Z ve SQ-K gruplarının serum kreatinin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Kontrol grubu ile ADR grubu kreatinin değerleri arasında belirgin fark olmasına rağmen, istatistiksel anlamlılık elde edilememesi kontrol grubundaki denek sayısının 3 olmasına bağlandı. ADR+SQ-Z ve ADR+SQ-KK gruplarının kreatinin değerleri ile; kontrol, SQ-Z ve SQ-K gruplarının kreatinin değerleri arasında ise anlamlı fark saptanmaması, SQ uygulanan gruplarda böbrek fonksiyonlarının daha iyi seyrettiği sonucuna varmamızı sağladı.

Çalışmamızda deneklerin BUN düzeyleri adriyaminin uygulanan gruplarda 22. günde, kontrol ve SQ-KK gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı. Araştırmamızda ADR+SQ-KK grubunda erken kayıplar gözlemlendiği için 3 sıçandan kan analizi yapılabildi, sıçanlardan birinin kan BUN düzeyleri oldukça yüksek olduğundan (133,10 gr/dl) bu gruba ait ortalama değerin diğer gruplara göre belirgin yüksek olmasına neden olmuştur.

Sıçanların kan albümin ve total protein değerleri arasında korelasyon olduğu gözlemlendi. 22. gün total protein ve albümin değerleri ADR uygulanan gruplarda, diğer gruplara göre anlamlı düzeyde düşük saptandı. Adriyaminin nefropatisinde gözlenmesi öngörülen kan protein ve albümin düzeyinde düşme çalışmamızda da gözlenirken, skualen ile birlikte ADR uygulamasının kan total protein ve albümin düzeylerindeki düşmeyi azaltıcı yönde etkisi olmadı.

24 saatlik idrar analizlerini ele aldığımızda, ADR uygulanan tüm gruplarda 14. günde proteinüri saptandı. ADR+SQ-KK grubu ile kontrol, SQ-K ve SQ-Z gruplarının 14. gün proteinüri değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmakla birlikte, ADR grubunda proteinüri değerlerinin de oldukça yüksek olmasına rağmen diğer gruplar ile

arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması, kontrol grubundaki denek sayısının azlığı ile ilişkilendirildi. ADR+SQ-Z grubuna ait sıçanların proteinüri değerleri; ADR ve ADR+SQ-KK gruplarına göre daha düşük; kontrol, SQ-KK ve SQ-Z gruplarına göre ise daha yüksek izlendi. Fakat bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Adriyaminin uygulanan ADR ve ADR+SQ-Z gruplarında 22. günde proteinüri saptandı, ancak ADR'ye ek olarak SQ-Z uygulanan grubun proteinüri değerleri; yalnız ADR uygulanan gruba göre belirgin olarak düşük saptandı. ADR+SQ-KK grubundaki sıçanlarda ise erken kayıplar gözlenmesi nedeni ile erken sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildiğinden bu gruba ait 22. gün idrar verileri elde edilemedi. 14. gün idrar proteinüri değerleri; ADR+SQ-Z ve ADR+SQ-KK grupları arasında karşılaştırıldığında ise SQ-Z uygulaması ile proteinüri değerlerinde daha fazla düşüş olduğu dikkati çekti. Literatürde belirtildiği şekilde çalışmamızda da adriyaminin ile beklenen sürede proteinüri oluştu ve ADR'ye ek olarak SQ-Z uygulanan grupta 14 ve 22. gün proteinüri değerlerinde azalma olduğu görüldü.

Çalışmamızda ADR uygulanan gruplardaki idrar kreatinin değerlerinde azalma olmakla birlikte 14. ve 22. gün idrar kreatinin değerlerinde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. İdrar üre atılımında da, idrar kreatinin değerleri ile paralel şekilde ADR uygulanan gruplarda düşüş izlendi.

Histopatolojik bulguları değerlendirdiğimizde, çalışmamızda 7,5 mg/kg adriyaminin ile 22 günde glomerüllerde segmental skleroz bulgularının olduğu görüldü. PAS ve PAMS histokimyasal yöntemleri ile değerlendirilen segmental skleroz skorlarının ortalamaları karşılaştırıldığında; ADR ile birlikte SQ-KK ve SQ-Z uygulanan gruplarda, yalnız ADR uygulanan gruba göre ortalama değerleri arasında belirgin düşüklük olduğu dikkati çekti. Kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarının skleroz skor ortalamaları ile ADR grubunun ortalama değerleri arasında anlamlı fark gözlenmesine karşılık, bu gruplar ile ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z grupları arasındaki değerlerde anlamlı fark gözlenmedi. Bu bulgularla hem köpek balığı hem zeytinyağı kaynaklı SQ uygulamasının sıçanlardaki segmental skleroz skorlarını düşürdüğü sonucuna varıldı.

Saptanan en yüksek segmental skleroz skorları da, segmental skleroz skor ortalamaları ile benzer şekilde: ADR+SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarında, ADR grubuna göre daha düşük; kontrol, SQ-Z ve SQ-KK gruplarına göre ise daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak gruplara ait az sayıda veri olduğundan, yapılan ki-kare analizi sonuçları istatistiksel olarak yorumlamaya uygun olmamıştır.

Segmental skleroz skorlarının ortalama değerleri arttıķa, kan total protein ve albümin ile idrar kreatinin ve üre değerlerinde düşme gözlenirken; idrar proteinüri, kan kreatinin ve BUN değerlerinde artış gözlenmiş olması; çalışmamızdaki histopatolojik değerlendirmenin biyokimyasal analizler ile paralel seyrettiğini göstermektedir.

Çalışmamızdaki morfometrik ölçümlerde glomerüler yumak ve Bowman kapsül alan ölçüm değerlerinin birbirleri ile çok yüksek düzeyde korele oldukları saptandı. Literatürde glomerüler boyutun yaş, cinsiyet, vücut ve böbrek ağırlığı, ırk ile farklılık gösterdiği ve (212,213) kapsül alanının, glomerüler yumak alanından yaklaşık 1.4 kat büyük olup, kapsül ve yumak alanlarının birbirleri ile korele oldukları belirtmektedir (214).

Araştırmamızda tüm ADR uygulanan gruplarda Bowman ve glomerüler yumak alanlarının azaldığını, fakat ADR ile birlikte SQ-KK ve SQ-Z uygulaması ile Bowman ve glomerüler yumak alanlarındaki düşmenin, sadece ADR uygulanan gruba göre daha az olduğunu saptadık. Adriyamin ile birlikte SQ-KK uygulanan grupta ortalama glomerüler Bowman alan ölçümlerinin kontrol grubu ile benzer değerlere sahip olduğu ve SQ-KK+ADR ile ADR grupları ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü. Bu sonuçların ADR+SQ-KK grubundaki sıçanların 3'ünde gözlenen şiddetli glomerüler TMA bulguları nedeni ile ölçülen glomerüler alanların artmış olduğuna bağlı olabileceği düşünöldü. Kontrol grubuna ait ortalama Bowman alanları, ADR grubuna göre belirgin yüksek olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlılık saptanmaması, kontrol grubunda 3 adet sıçan olmasına bağlandı. Wang (138) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada adriyamin uygulaması ile sıçanların glomerüler alanlarının azaldığını saptanmıştır. Javaid ve arkadaşları da ADR ile oluşturulan nefropati modelinde glomerüler volümlerde orta düzeyde azalma olduğu bildirilmektedir (202).

Çalışmamızdaki Bowman ve glomerüler yumak alanlarının; kan ve idrar biyokimyasal analizleri ile ilişkilerini değerlendirdiğimizde; her iki alan ölçümü azaldıkça, idrar proteinüri değerleri ile kan BUN ve kreatinin değerlerinde artış; idrar üre ve kreatinin değerleri ile kan total protein ve albümin değerlerinde ise azalma olduğunu izledik. Ayrıca glomerüler yumak alan ölçümlerinin; idrar proteinüri değerleri, tüm kan analizleri ve PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları ile korelasyon ilişkisinin, Bowman alan ölçümlerine kıyasla daha yüksek olduğunu saptadık. Sasaki ve arkadaşları da literatürde Bowman kapsül alanının yaş, hipertansiyon ve obezite gibi faktörlerden önemli ölçüde

etkilendiğini, bu nedenle glomerüler yumak alanı ile Bowman kapsül alanı arasındaki oranın daha değerli olduğunu bildirmektedir (215).

Çalışmamızda ADR uygulaması ile ortalama glomerüler WT-1 pozitif podosit sayılarının azalmış olduğunu saptadık. Ancak ADR uygulamasına ek olarak verilen SQ-Z ile; ortalama WT-1 değerlerinin kontrol, SQ-KK ve SQ-Z grupları ile benzer ve ADR+SQ-Z uygulanan gruptaki ortalama WT-1 pozitif podosit sayısının yalnızca ADR uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu saptandı ($p=0.031$). Bu bulgu SQ-Z uygulamasının podosit sayısındaki azalmayı, dolayısıyla podosit hasar şiddetini azalttığını desteklemektedir. ADR+SQ-KK grubunda ise ortalama WT1 pozitif podosit sayısı ADR grubuna göre daha fazla olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu bulgular ile; SQ-Z'nin SQ-KK'ye göre podositopeni üzerine iyileştirici etkisinin, daha fazla olabileceğini düşündük. Ortalama WT-1, en yüksek WT-1 ve en düşük WT-1 değerlerinde ADR grubu ile kontrol grubu arasında belirgin farklılık olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık saptanamaması, kontrol grubundaki denek sayısının azlığı ile açıklandı. İdrar proteinüri ile kan kreatinin ve BUN düzeyleri arttıkça, ortalama WT1 değerlerinin anlamlı düzeyde azaldığının gözlenmiş olması, WT1 pozitif podosit sayısı ile klinik ölçütler arasındaki uyumu göstermektedir. Ayrıca segmental skleroz alanlarında WT1 podosit sayısının azaldığını bildiren literatür bilgileri ile uyumlu şekilde biz de çalışmamızda segmental skleroz skor ortalamaları arttıkça, podosit sayılarındaki azalmayı yansıtacak şekilde WT1 ortalamaları, en yüksek ve en düşük WT-1 değerlerinin azaldığını saptadık.

İnterstisyel enflamasyon ve tübüler hasarlanma bulgularını değerlendirdiğimizde, en yoğun olarak yalnızca ADR uygulanan grupta olmak üzere, tüm ADR uygulanan gruplarda interstisyel enflamasyon ve tübüler hasarlanma bulguları izledik. Adriyamin ile birlikte SQ-KK ve SQ-Z uygulanan gruplarda, yalnızca ADR uygulanan gruba göre tübüler hasar ve interstisyel enflamasyon bulgularının şiddetinde belirgin azalma saptanmıştır. Ancak skorsal ölçütler olan bu verilerin değerlendirilmesinde, çoğu sıçan 0 skorunu aldığından ve kalan veri sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel olarak anlamlılık yorumu yapabilmek mümkün olmamıştır.

Çalışmamızda kontrol, SQ-KK ve SQ-Z gruplarındaki sıçanlarda interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi izlenmemiştir. ADR+ SQ-KK ve ADR+SQ-Z gruplarında ise ADR grubuna göre çok daha az sayıdaki sıçanda bulgular gözlenmiştir. Bu bulgularla birlikte skorsal ölçütler olan bu verilerin değerlendirilmesinde veri sayısının azlığı ve bulguların izlendiği

sıçanların tümünde her iki ölçüt için skor 1 olduğu için istatistiksel analiz uygulanamamıştır. Çalışmamızda interstisyel enflamasyon ile tübüler hasarlanma bulguları arasında korelasyon izlenmiş olup, ayrıca bu bulguların şiddeti arttıkça kan BUN ve kreatinin değerleri ile idrar proteinüri değerlerinin arttığı, kan total protein ve albümin değerleri ile idrar kreatinin ve üre değerlerinin ise azaldığı gözlenmiştir. PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz ortalamaları ile interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulgularının varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Ayrıca segmental skleroz ölçütünden alınan en yüksek skor arttıkça, interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulgularının görülme sıklığının da arttığı görülmüştür.

Araştırmamızda ADR+SQ-KK grubuna ait iki sıçanda glomerüllerde ve arteriollerde şiddetli ve yaygın, bir sıçanda ise glomerüllerde fokal akut TMA bulguları izledik. Ayrıca yalnız ADR uygulanan gruptaki sıçanların birinde de glomerüllerde fokal TMA bulguları dikkati çekti. ADR+SQ-KK grubundaki TMA bulguları izlenen sıçanların tümü planlanan deney bitiş tarihinden önce kaybedilen sıçanlar olduğundan, bu gruptaki hayvanların erken ölüm nedeninin TMA olduğu düşünüldü.

Çalışmamızda kullandığımız skualenin birçok hastalık modeli üzerine etkisi in vivo ve in vitro düzeyde çalışılmış olup, yakın zamanda Türkiye kaynaklı bir çalışma haricinde böbrek hasarı üzerine etkisini bildiren araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmada farelerde sisplatin ile uyarılan böbrek hasarı modelinde, skualen kullanımı ile antioksidatif belirleyiciler ve böbrek dokularında IFN- γ ekspresyonlarında azalma, böbrekte gözlenen histopatolojik bulguların şiddetinin azaldığı görülmüştür (131). Ancak bu çalışma, daha çok skualenin antioksidan etkileri ve yolakları üzerine odaklanmış olup, histopatolojik değerlendirme ölçütleri oldukça kısıtlıdır ve bizim araştırmamız ile karşılaştırılabileceğimiz düzeyde veri sağlamamaktadır.

Literatürde yer alan diğer ajanların podosit hasarı üzerine etkisini araştıran çalışmalarda da; genelde biyokimyasal, enzimatik ve moleküler değişiklikler üzerinde durulmuş olup, bizim çalışmamız ile karşılaştırılabileceğimiz düzeyde ayrıntılı patolojik bulgulara ait veri sağlayan araştırma sayısı kısıtlıdır.

Çalışmamızda SQ-Z ile birlikte ADR uygulanan grupta 14 ve 22. gün idrar proteinüri değerleri azalmış olmasına rağmen, istatistiksel fark gözlenmedi. Literatürde etkinliği araştırılan ajanlar arasında olan ATRA ile farklı metot ile oluşturulan FSGS modelinde (koyun antiglomerüler bazal membran antikoru) istatistiksel olarak proteinüri değerlerinde anlamlı

düzeyde azalma gözlenmiş ($p<0.01$) olması, ADR uygulamasının daha ağır ve yaygın böbrek hasar oluşturabileceği ihtimalini düşündürdü. Aynı çalışmada ATR uygulanan grup ile diğer gruplar arasında kan BUN seviyeleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bizim bulgularımızda BUN düzeyleri SQ-Z +ADR uygulanan grupta daha düşük olmasına rağmen bu grup ile kontrol ve yalnızca ADR uygulanan gruplar arasındaki fark anlamlı saptanmamıştır.

Yaş ile birlikte spontan ilerleyici glomerüler hasar gelişen Wistar Frömter sıçanlarında 2 hafta süre ile ACE inhibitörü kullanımı ile idrar proteinüri düzeyleri ile glomerüler segmental skleroz ve kresent yaygınlığında değişiklik gözlenmemiş, ancak 10 hafta süre ile ACE inhibitör tedavisi kullanıldığında ise proteinüri ($p<0.01$) ve serum kreatinin ($p<0.05$) değerlerinde, glomerüler kresent/segmental skleroz lezyonlarının sayı ve yaygınlığında ($p<0.01$) anlamlı düzeyde azalma görülmüştür (177). Bizim çalışmamızda da skualen uygulaması ile saptadığımız proteinüri değerlerindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmaması, skualen doz ve kullanım süresi ile ilişkili olabilir. Aynı grup tarafından yine ilerleyici glomerüler hasar gelişen Wistar Frömter sıçanlarında yapılan çalışmada, 10 hafta (50-60. Haftalar arası) ACE inhibitörü kullanımı ile glomerüler yumak alanları ortalamasında değişiklik saptanmamış, glomeruloskleroz indekisinde ise 3.4'ten 2.9' gerileme olmuştur ($p<0.05$). İnterstisyel fibrozis, tubuler atrofi ve interstisyel enflamasyon skorları ACE inhibitörleri ile tedavi edilen grupta azalmasına rağmen, gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (178). Araştırmamızdaki bulgulara bakacak olursak, skualen kullanımı ile kontrol grubuna göre izlenen glomerüler yumak ve Bowman alanlarındaki düşmede azalma olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü. Segmental skleroz skor ortalamalarında da azalma izlenmekle birlikte (0.29'dan 0.11(SQ-KK) ve 0.10 (SQ-Z)) istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. İnterstisyel fibrozis, tubuler atrofi ve interstisyel enflamasyon skorları skualen uygulaması ile belirgin azalma göstermekle birlikte, veri sayımızın azlığı nedeni ile ACE inhibitörleri benzer şekilde gruplar arasında istatistiksel analiz yapılamamıştır. Literatürde glomerüler sklerotik lezyonlarının yaygınlığı arttıkça, glomerül başına düşen WT-1 pozitif podosit sayısında saptanan azalma ($p<0.01$) (179), bizim sonuçlarımız ile korelasyon göstermektedir ($p<0.01$). Ayrıca ACE inhibitörleri ile glomerül başına düşen WT-1 pozitif podosit sayısında saptanan artış, araştırmamızda ADR'ye eklenen SQ-Z uygulaması ile de anlamlı düzeyde ($p=0.031$) izlenmiş olup, zeytinyağı kaynaklı skualenin podositopeniyi azaltıcı etkisi olabileceğini desteklemektedir.

Literatürde trombotik mikroanjiopatinin birçok ajanla indüklenebildiği bilinse de (216), skualen ile uyarılan TMA varlığına literatürde rastlanmadı. Çalışmalarda sıçanlarda yapılan deneysel modelde, başlangıçta 3 mg/kg, 12. Haftada 1,5 mg/kg olarak iki doz ADR uygulaması sonrası böbreklerde, glomerüllerde daha yoğun olmak üzere arteriol ve interlobüler arteriollerde de gözlenen, eozinofilik fibrinoid materyal birikimi ile karakterize TMA bulgularının izlendiği bildirilmiştir (217). İzlenen TMA bulgularının uygulanan ADR dozundan bağımsız olduğu düşünülmektedir (217). Benzer TMA bulguların insanlarda ADR içeren kemoterapi rejimlerinin uygulanması ile de görülebildiği literatürde yer alan bilgiler arasındadır (218,219). Ayrıca yan etki profili daha dar olan adriyamisin lipozomal enkapsüle formu ile tedavi edilen over karsinom tanılı hastalarda da TMA bulgularının geliştiği gösterilmiştir (220). Literatürde köpek balığı karaciğeri kaynaklı SQ uygulamasının böbrekte TMA bulgularına neden olabileceğine dair bilgi olmasa da, ADR ile birlikte SQ-KK uygulamasının aditif etki yaparak TMA riskini arttırabileceğine dair de veri bulunmamaktadır. Yalnızca ADR grubundaki sıçanlara göre bile, ADR+SQ-KK uygulanan grupta daha yaygın ve şiddetli TMA bulgularının izlenmesi, SQ-KK ile ADR'nin birlikte uygulamasının TMA'ya yol açabileceği yönünde şüphenin doğmasına neden olmuştur. Bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ve ek verilere ihtiyaç vardır.

Araştırmamızdaki kısıtlılıklara değinecek olursa, kontrol grubu sayısındaki sıçan sayısının azlığı nedeni ile bazı istatistiksel verilerde anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Benzer şekilde ki-kare istatistiksel analizi uygulanan verilerin de genel olarak azlığı nedeni ile istatistiksel yorumlama yapılamamıştır. Skualen uygulamasının TMA bulgularına neden olup olmadığı veya ADR'nin TMA etkisine arttırdığına yönelik veri bulunmamaktadır. Köpekbalığı karaciğer kaynaklı SQ grubunda, diğer gruplara göre göz ardı edilmeyecek sıklıkta TMA bulguları gözlemlememiz, KK-SQ'nin TMA'ya etkisinin/katkısının olup olmadığının araştırılması gerekmektedir. Çalışmamızda ADR uygulamasında önce SQ vermeye başladığımız için, bu konuda SQ'nin hasar oluştuktan sonraki etkilerine yönelik prospektif koruyucu etkisinin olup olmayacağı belirsizdir.

Çalışmamızda; SQ-KK ve SQ-Z formları uygulanan sıçanlarda, bazı biyokimyasal ve histopatolojik böbrek hasar bulgularında iyileşme olduğu izlenmiştir. Ülkemizin önde gelen üreticilerinden olduğu SQ-Z'nin, böbrek hasarını azaltıcı etkinliği SQ-KK ile benzer olup, SQ-Z desteği verilen grupta TMA bulgularının gelişmemesi, SQ-KK'ya göre üstün olabileceğini düşündürmüştür. Böbrek dokusunda izlenen histopatolojik bulgulardaki

düzelmenin hangi mekanizmalar ile oluşabileceği de hedeflediğimiz araştırmalar arasındadır. Bu amaçla in vitro podosit hücre kültürlerinde, SQ etkinliğini ve mekanizmalarını moleküler düzeyde gösterecek çalışmalar yapılması planlanmaktadır. Skualenin in vivo ve in vitro düzeyde böbrek dokusu üzerindeki etkileri, farklı doz ve sürelerde yapılacak araştırmalarla desteklenerek; FSGS gibi podositopati mekanizması ile oluşan glomerüler hastalıklar ile adriyamin gibi nefrotoksik ajanlar içeren tedavi modalitelerinde, nefrotoksisiteyi azaltmak amacıyla ek tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR

1- Adriyaminin uygulamasına eklenen SQ-KK ve SQ-Z ile, sıçanların ishal bulgularının şiddetinde ve süresinde azalma, bu grupların genel durumlarında iyileşme, hareketliliklerinde artma olmaktadır.

2- Adriyaminin uygulamasına eklenen SQ-KK ve SQ-Z ile serum kreatinin değerlerinde azalma olmaktadır. Serum BUN seviyeleri ise SQ-Z eklenen grupta azalma göstermektedir.

3- Adriyaminin uygulamasına eklenen SQ-KK ve SQ-Z'nin, kan total protein ve albümin seviyelerinde düşmeye etkisi olmamaktadır.

4- İdrar proteinüri değerleri, SQ-Z eklenmesi ile daha belirgin olmak üzere, skualen uygulaması ile azalma göstermektedir.

5- Skualen uygulaması ile idrar üre ve kreatinin atılımları artmaktadır.

6- Adriyaminin uygulamasına eklenen SQ-KK ve SQ-Z, glomerüler segmental skleroz şiddetini ve yaygınlığını azaltmaktadır.

7- Adriyaminin uygulamasına eklenen SQ-KK ve SQ-Z ile; Bowman ve glomerüler yumak alanlarındaki küçülme miktarı azalmaktadır.

8- Adriyaminin uygulamasına eklenen SQ-KK ve SQ-Z, SQ-Z ile daha belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı olmak üzere; farklılaşmış podosit hücre belirteci olan WT-1 protein ifade seviyelerinde artışa yol açmaktadır.

10- Adriyaminin ile birlikte SQ-KK ve SQ-Z uygulanan gruplarda, tübüler hasar ve interstisyel enflamasyon bulgularının şiddetinde azalma olmaktadır.

11- Adriyaminin ile birlikte SQ-KK ve SQ-Z uygulanan gruplarda daha az sayıda sıçanda interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulguları görülmektedir.

12- Bowman ve glomerüler yumak alanları küçüldükçe, idrar proteinüri değerleri ile kan BUN ve kreatinin değerlerinde artış; idrar üre ve kreatinin değerleri ile kan total protein ve albümin değerlerinde ise azalma olmaktadır.

13- Glomerüler yumak alan ölçümlerinin; idrar proteinüri değerleri, tüm kan analizleri ve PAS ve PAMS ile değerlendirilen segmental skleroz skor ortalamaları ile gösterdiği korelasyon ilişkisi, Bowman alan ölçümlerine kıyasla daha yüksektir.

14- Segmental skleroz skorlarının şiddet ve yaygınlığı arttıkça; kan total protein ve albümin ile idrar kreatinin ve üre değerlerinde düşme; idrar proteinüri, kan kreatinin ve BUN değerlerinde artış gözlenmektedir.

15- Ortalama glomerüler WT1 ekspresyonları azaldıkça, idrar proteinüri ile kan kreatinin ve BUN düzeyleri artmaktadır.

16- Glomerüler segmental skleroz ortalamaları ile interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulgularının varlığı arasındaki ilişki bulunmaktadır.

17- Glomerüler segmental skleroz ölçütünden alınan en yüksek skor arttıkça, interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi bulgularının görülme sıklığı artmaktadır.

18- Adriyamin ile birlikte SQ-KK uygulaması ile yaygın akut TMA bulgularının gözlenmesinin, SQ-KK uygulamasının TMA' neden olabileceği veya ADR'nin TMA etkilerine katkıda bulunabileceği ihtimalini akla getirmektedir. Bu konuda ek veri sağlayacak araştırmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. D'Agati V. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003;
2. Braden GL, Mulhern JG, O'Shea MH, Nash S V., et al. Changing incidence of glomerular diseases in adults. *Am J Kidney Dis.* 2000;
3. Haas M, Meehan SM, Karrison TG, Spargo BH. Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: A comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *Am J Kidney Dis.* 1997;
4. Troyanov S, Wall CA, Miller JA, Scholey JW, et al. Focal and segmental glomerulosclerosis: Definition and relevance of a partial remission. *J Am Soc Nephrol.* 2005;
5. Banfi G, Moriggi M, Sabadini E, Fellin G, et al. The impact of prolonged immunosuppression on the outcome of idiopathic focal-segmental glomerulosclerosis with nephrotic syndrome in adults. A collaborative retrospective study. *Clin Nephrol.* 1991;
6. Rydel JJ, Korbet SM, Borok RZ, Schwartz MM. Focal segmental glomerular sclerosis in adults: Presentation, course, and response to treatment. *Am J Kidney Dis.* 1995;
7. Wehrmann M, Bohle A, Held H, Schumm G, et al. Long-term prognosis of focal sclerosing glomerulonephritis. An analysis of 250 cases with particular regard to tubulointerstitial changes. *Clin Nephrol.* 1990;
8. Cameron JS, Turner DR, Ogg CS, Chantler C, et al. The long-term prognosis of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Nephrol.* 1978;
9. Velosa JA, Donadio J V., Holley KE. Focal sclerosing glomerulonephropathy. A clinicopathologic study. *Mayo Clin Proc.* 1975;
10. Beaufils H, Alphonse JC, Guedon J, Legrain M. Focal Glomerulosclerosis: Natural History and Treatment. *Nephron.* 1978;
11. Sarioğlu S, Irmak Yüzügüldü R. The impact of squalene on disease models. *J Curr Pathol.* 2018;
12. Genel T. G ve TBK, Müdürlüğü. Zeytin ve Zeytinyağı Raporu. 2015.
13. Tortora G. Principles of Anatomy and Physiology 12th ed - G. Tortora. John Wiley & Sons, Inc. 2009.
14. Schoen FJ, Mitchell RN. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier Inc. 2015.
15. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiological Reviews.* 2008.
16. Karnovsky MJ, Ainsworth SK. The structural basis of glomerular filtration. *Advances*

in nephrology from the Necker Hospital. 1972.

17. Zhang D. Heptinstall's Pathology of the Kidney - 6th Edition. Shock. 2008;
18. Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, Li J, et al. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell*. 1998;
19. Drenckhahn D, Franke RP. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Investig*. 1988;
20. Patrie KM, Drescher AJ, Welihinda A, Mundel P, et al. Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and alpha-actinin-4, with the tight junction protein MAGI-1. *J Biol Chem*. 2002;
21. Winn MP. 2007 Young investigator award: TRP'ing into a new era for glomerular disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008.
22. Kodner C. Nephrotic syndrome in adults: Diagnosis and management. *American Family Physician*. 2009.
23. Pal A, Kaskel F. History of nephrotic syndrome and evolution of its treatment. *Frontiers in Pediatrics*. 2016.
24. Cameron JS. The Nephrotic Syndrome and Its Complications. *Am J Kidney Dis*. 1987;
25. Valentini, R. P., Smoyer, W. E., Kher, K. K., Schnaper, H. W., & Makker SP. Clinical pediatric nephrology. *Nephrotic Syndr 2nd ed Abingdon, Oxon Inf Healthc*. 2006;155–94.
26. Mathieson PW. Minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis. *Seminars in Immunopathology*. 2007.
27. Deegens JKJ, Dijkman HBPM, Borm GF, Steenbergen EJ, et al. Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2008;
28. Deegens JKJ, Steenbergen EJ, Wetzels JFM. Review on diagnosis and treatment of focal segmental glomerulosclerosis. *Netherlands Journal of Medicine*. 2008.
29. D'Agati VD, Barry SM. Focal segmental glomerulosclerosis. In: Heptinstall's Pathology of the Kidney. 2014.
30. Jones CL, Buch S, Post M, McCulloch L, et al. Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Am J Pathol*. 1992;
31. Ichikawa I, Fogo A. Focal segmental glomerulosclerosis. In: *Pediatric Nephrology*. 1996.
32. Schwartz MM, Korbet SM. Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: Pathology, Histological Variants, and Pathogenesis. *Am J Kidney Dis*. 1993;
33. Meyrier A. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. *Nature clinical*

- practice. *Nephrology*. 2005.
34. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. Pathologic Classification of Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Working Proposal. *Am J Kidney Dis*. 2004;
 35. Deegens JKJ, Steenbergen EJ, Borm GF, Wetzels JFM. Pathological variants of focal segmental glomerulosclerosis in an adult Dutch population - Epidemiology and outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;
 36. Howie AJ, Pankhurst T, Sarioglu S, Turhan N, et al. Evolution of nephrotic-associated focal segmental glomerulosclerosis and relation to the glomerular tip lesion. *Kidney Int*. 2005;
 37. Howie AJ, Brewer DB. The glomerular tip lesion: A previously undescribed type of segmental glomerular abnormality. *J Pathol*. 1984;
 38. Stokes MB, Valeri AM, Markowitz GS, D'Agati VD. Cellular focal segmental glomerulosclerosis: Clinical and pathologic features. *Kidney Int*. 2006;
 39. Detwiler RK, Falk RJ, Hogan SL, Jennette JC. Collapsing glomerulopathy: A clinically and pathologically distinct variant of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 1994;
 40. Reidy K, Kaskel FJ. Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatric Nephrology*. 2007.
 41. Kwoh C, Shannon MB, Miner JH, Shaw A. Pathogenesis of nonimmune glomerulopathies. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2006;
 42. De Heer E, Sijpkens YWJ, Verkade M, den Dulk M, et al. Morphometry of interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;
 43. Jefferson JA, Shankland SJ. The Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Advances in Chronic Kidney Disease*. 2014.
 44. Somlo S, Mundel P. Getting a foothold in nephrotic syndrome. *Nature Genetics*. 2000.
 45. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;
 46. D'Agati VD. The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: New insights. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2008.
 47. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. *Kidney International*. 2007.
 48. Reiser J. Novel concepts in understanding and management of glomerular proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;
 49. Kriz W. The pathogenesis of "classic" focal segmental glomerulosclerosis--lessons from rat models. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;
 50. Sato Y, Wharram BL, Sang KL, Wickman L, et al. Urine podocyte mRNAs mark

- progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009;
51. Trimarchi H. Podocyturia: Potential applications and current limitations. *World J Nephrol*. 2017;
 52. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, et al. Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: Diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol*. 2005;
 53. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*. 2012.
 54. Tharaux PL, Huber TB. How Many Ways Can a Podocyte Die? *Semin Nephrol*. 2012;
 55. Wang S, Kim JH, Moon KC, Hong HK, et al. Cell-Cycle Mechanisms Involved in Podocyte Proliferation in Cellular Lesion of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis*. 2004;
 56. Marshall CB, Krofft RD, Pippin JW, Shankland SJ. CDK inhibitor p21 is prosurvival in adriamycin-induced podocyte injury, in vitro and in vivo. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2010;
 57. Petermann AT, Pippin J, Hiromura K, Monkawa T, et al. Mitotic cell cycle proteins increase in podocytes despite lack of proliferation. *Kidney Int*. 2003;
 58. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2006;
 59. Lasagni L, Romagnani P. Glomerular epithelial stem cells: The good, the bad, and the ugly. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010.
 60. Romagnani P. Toward the identification of a "renopoietic system"? *Stem Cells*. 2009.
 61. Appel D, Kershaw DB, Smeets B, Yuan G, et al. Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2009;
 62. Peired A, Angelotti ML, Ronconi E, La Marca G, et al. Proteinuria impairs podocyte regeneration by sequestering retinoic acid. *J Am Soc Nephrol*. 2013;
 63. Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, Lazzeri E, et al. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol*. 2009;
 64. Lim BJ, Yang JW, Do WS, Fogo AB. Pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 2016.
 65. Smeets B, Uhlig S, Fuss A, Mooren F, et al. Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2009;
 66. Kim S, Kim YH, Choi KH, Jeong HJ. Glomerular epithelial CD44 expression and segmental sclerosis in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol*. 2016;

67. Froes BP, de Almeida Araújo S, Bambirra EA, Oliveira EA, et al. Is CD44 in glomerular parietal epithelial cells a pathological marker of renal function deterioration in primary focal segmental glomerulosclerosis? *Pediatr Nephrol.* 2017;
68. Smeets B, Stucker F, Wetzels J, Brocheriou I, et al. Detection of activated parietal epithelial cells on the glomerular tuft distinguishes early focal segmental glomerulosclerosis from minimal change disease. *Am J Pathol.* 2014;
69. Wanner N, Hartleben B, Herbach N, Goedel M, et al. Unraveling the role of podocyte turnover in glomerular aging and injury. *J Am Soc Nephrol.* 2014;
70. Berger K, Schulte K, Boor P, Kuppe C, et al. The regenerative potential of parietal epithelial cells in adult mice. *J Am Soc Nephrol.* 2014;
71. Kuppe C, Leuchtle K, Wagner A, Kabgani N, et al. Novel parietal epithelial cell subpopulations contribute to focal segmental glomerulosclerosis and glomerular tip lesions. *Kidney Int.* 2019;
72. Benigni A, Morigi M, Rizzo P, Gagliardini E, et al. Inhibiting angiotensin-converting enzyme promotes renal repair by limiting progenitor cell proliferation and restoring the glomerular architecture. *Am J Pathol.* 2011;
73. Zhang J, Pippin JW, Vaughan MR, Krofft RD, et al. Retinoids augment the expression of podocyte proteins by glomerular parietal epithelial cells in experimental glomerular disease. *Nephron - Exp Nephrol.* 2012;
74. Zhang J, Pippin JW, Krofft RD, Naito S, et al. Podocyte repopulation by renal progenitor cells following glucocorticoids treatment in experimental FSGS. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2013;
75. Darisipudi MN, Kulkarni OP, Sayyed SG, Ryu M, et al. Dual blockade of the homeostatic chemokine CXCL12 and the proinflammatory chemokine CCL2 has additive protective effects on diabetic kidney disease. *Am J Pathol.* 2011;
76. Sayyed SG, Hägele H, Kulkarni OP, Endlich K, et al. Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2009;
77. Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol.* 2008;
78. Marrero MB, Banes-Berceli AK, Stern DM, Eaton DC. Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 2006.
79. Noh H, King GL. The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. In: *Kidney International.* 2007.
80. Micili SC, Ergur BU, Ozoğul C, Sarioğlu S, et al. Effects of lipoic acid in an experimentally induced hypertensive and diabetic rat model. *Clin Exp Hypertens.* 2013;

81. Xing CY, Saleem MA, Coward RJ, Ni L, et al. Direct effects of dexamethasone on human podocytes. *Kidney Int.* 2006;
82. Zhong J, Whitman JB, Yang HC, Fogo AB. Mechanisms of Scarring in Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 2019.
83. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. In: *Lancet.* 2003.
84. Rosenberg AZ, Kopp JB. Focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;
85. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein - Nephricin - Is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell.* 1998;
86. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* 2000;
87. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, et al. Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2000;
88. Yao J, Le TC, Kos CH, Henderson JM, et al. α -actinin-4-mediated FSGS: An inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein. *PLoS Biol.* 2004;
89. Kriz W, Hosser H, Hähnel B, Gretz N, et al. From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: A histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;
90. Epstein FH, Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. Dietary Protein Intake and the Progressive Nature of Kidney Disease:: The Role of Hemodynamically Mediated Glomerular Injury in the Pathogenesis of Progressive Glomerular Sclerosis in Aging, Renal Ablation, and Intrinsic Renal Disease. *New England Journal of Medicine.* 1982.
91. Fogo AB. Progression and potential regression of glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2001;
92. Bagby SP. Obesity-initiated metabolic syndrome and the kidney: A recipe for chronic kidney disease? *Journal of the American Society of Nephrology.* 2004.
93. Fowler SM, Kon V, Ma L, Richards WO, et al. Obesity-related focal and segmental glomerulosclerosis: Normalization of proteinuria in an adolescent after bariatric surgery. *Pediatr Nephrol.* 2009;
94. Heybeli C, Oktan MA, Yıldız S, Ünlü M, et al. Mesangial C4d deposition is independently associated with poor renal survival in patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Exp Nephrol.* 2019;
95. Schiffer M, Schiffer LE, Gupta A, Shaw AS, et al. Inhibitory Smads and TGF- β signaling in glomerular cells. *J Am Soc Nephrol.* 2002;

96. Shimada M, Araya C, Rivard C, Ishimoto T, et al. Minimal change disease: A “two-hit” podocyte immune disorder? *Pediatr Nephrol*. 2011;
97. Artero ML, Sharma R, Savin VJ, Vincenti F. Plasmapheresis Reduces Proteinuria and Serum Capacity to Injure Glomeruli in Patients With Recurrent Focal Glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis*. 1994;
98. Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, et al. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*. 1996;
99. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med*. 2011;
100. Avila-Casado MDC, Perez-Torres I, Auran A, Soto V, et al. Proteinuria in rats induced by serum from patients with collapsing glomerulopathy. *Kidney Int*. 2004;
101. Berre U Le, Godfrin Y, Günther E, Buzelin F, et al. Extrarenal effects on the pathogenesis and relapse of idiopathic nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *J Clin Invest*. 2002;
102. Wei C, Möller CC, Altintas MM, Li J, et al. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med*. 2008;
103. Hayek SS, Sever S, Ko YA, Trachtman H, et al. Soluble urokinase receptor and chronic kidney disease. *N Engl J Med*. 2015;
104. Reiser J, Wei C, Tumlin J. Soluble urokinase receptor and focal segmental glomerulosclerosis. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2012.
105. Kidney Disease Improving Global Outcomes. KDIGO Clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Kidnet Int Suppl*. 2012;
106. Schnenberger E, Ehrich JH, Haller H, Schiffer M. The podocyte as a direct target of immunosuppressive agents. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011.
107. Gbadegesin R, Lavin P, Foreman J, Winn M. Pathogenesis and therapy of focal segmental glomerulosclerosis: An update. *Pediatric Nephrology*. 2011.
108. Chitalia VC, Wells JE, Robson RA, Searle M, et al. Predicting renal survival in primary focal glomerulosclerosis from the time of presentation. *Kidney Int*. 1999;
109. Albaqumi M, Barisoni L. Current views on collapsing glomerulopathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008.
110. Korbet SM, Schwartz MM, Lewis EJ. Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: Clinical Course and Response to Therapy. *American Journal of Kidney Diseases*. 1994.
111. Mariani LH, Martini S, Barisoni L, Canetta PA, et al. Interstitial fibrosis scored on whole-slide digital imaging of kidney biopsies is a predictor of outcome in proteinuric glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;
112. Philibert D, Cattran D. Remission of proteinuria in primary glomerulonephritis: We

- know the goal but do we know the price? *Nature Clinical Practice Nephrology*. 2008.
113. Goodman DS, Popjak G. Studies on the biosynthesis of cholesterol. XII. Synthesis of allyl pyrophosphates from mevalonate and their conversion into squalene with liver enzymes. *J Lipid Res*. 1960;
 114. Langdon RG, Bloch K. The biosynthesis of squalene. *J Biol Chem*. 1953;
 115. Kohno Y, Egawa Y, Itoh S, Nagaoka S ichi, et al. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab*. 1995;
 116. Dickhart W. The squalene contents of various oils. *Am J Pharm Sci Support Public Health*. 1955;
 117. Liu GCK, Ahrens EH, Schreibman PH, Crouse JR. Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application. *J Lipid Res*. 1976;
 118. Nenadis N, Tsimidou M. Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation. *JAOCs, J Am Oil Chem Soc*. 2002;
 119. Warleta F, Campos M, Allouche Y, Sánchez-Quesada C, et al. Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2010;
 120. Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Rosillo MÁ, Aparicio-Soto M, et al. Dietary squalene supplementation improves DSS-induced acute colitis by downregulating p38 MAPK and NFκB signaling pathways. *Mol Nutr Food Res*. 2015;
 121. Kabuto H, Yamanushi TT, Janjua N, Takayama F, et al. Effects of squalene/squalane on dopamine levels, antioxidant enzyme activity, and fatty acid composition in the striatum of Parkinson's disease mouse model. *J Oleo Sci*. 2013;
 122. Kamimura H, Koga N, Yoshimura H, Oguri K. Enhanced Elimination of Theophylline, Phenobarbital and Strychnine from the Bodies of Rats and Mice by Squalane Treatment. *J Pharmacobiodyn*. 1992;
 123. Richter E, Schafer SG. Effect of Squalane on Hexachlorobenzene (HCB) Concentrations in Tissues of Mice. *J Environ Sci Heal Part B*. 1982;
 124. Hospers GAP, Eisenhauer EA, De Vries EGE. The sulfhydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio- and chemoprotective agents. A review, indications for use and prospects. *British Journal of Cancer*. 1999.
 125. Das B, Yeger H, Baruchel H, Freedman MH, et al. In vitro cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity: Implications in cancer chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2003;
 126. Das B, Antoon R, Tsuchida R, Lotfi S, et al. Squalene selectively protects mouse bone marrow progenitors against cisplatin and carboplatin-induced cytotoxicity in vivo without protecting tumor growth. *Neoplasia*. 2008;

127. Sabeena Farvin KH, Anandan R, Kumar SHS, Shiny KS, et al. Effect of squalene on tissue defense system in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Pharmacol Res.* 2004;
128. Storm HM, Oh SY, Kimler BF, Norton S. Radioprotection of mice by dietary squalene. *Lipids.* 1993;
129. Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1999.
130. Smith TJ. Squalene: Potential chemopreventive agent. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2000.
131. Sakul A, Ozansoy M, Elibol B, Ayla Ş, et al. Squalene attenuates the oxidative stress and activates AKT/mTOR pathway against cisplatin-induced kidney damage in mice. *Turkish J Biol.* 2019;
132. Kramer A, Van Den Hoven M, Rops A, Wijnhoven T, et al. Induction of glomerular heparanase expression in rats with adriamycin nephropathy is regulated by reactive oxygen species and the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol.* 2006;
133. Lebrecht D, Setzer B, Rohrbach R, Walker UA. Mitochondrial DNA and its respiratory chain products are defective in doxorubicin nephrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;
134. Takahashi Y, Ikezumi Y, Saitoh A. Rituximab protects podocytes and exerts anti-proteinuric effects in rat adriamycin-induced nephropathy independent of B-lymphocytes. *Nephrology.* 2017;
135. Weening JJ, Rennke HG. Glomerular permeability and polyanion in Adriamycin nephrosis in the rat. *Kidney Int.* 1983;
136. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. Sequence of pathologic events. *Lab Investig.* 1982;
137. Song H, Li X, Zhu C, Wei M. Glomerulosclerosis in Adriamycin-induced nephrosis is accelerated by a lipid-rich diet. *Pediatr Nephrol.* 2000;
138. Wang Y, Mahajan D, Tay YC, Bao S, et al. Partial depletion of macrophages by ED7 reduces renal injury in Adriamycin nephropathy. *Nephrology.* 2005;
139. Manabe N, Kinoshita A, Yamaguchi M, Furuya Y, et al. Changes in Quantitative Profile of Extracellular Matrix Components in the Kidneys of Rats with Adriamycin-induced Nephropathy. *J Vet Med Sci.* 2001;
140. Grond J, Weening JJ, Elema JD. Glomerular sclerosis in nephrotic rats. Comparison of the long-term effects of adriamycin and aminonucleoside. *Lab Investig.* 1984;
141. Rangan GK, Coombes JD. Renoprotective effects of sirolimus in non-immune initiated focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;
142. Lu YH, Deng AG, Li N, Song MN, et al. Changes in angiopoietin expression in glomeruli involved in glomerulosclerosis in rats with daunorubicin-induced nephrosis.

Acta Pharmacol Sin. 2006;

143. Deepa PR, Varalakshmi P. Influence of a low-molecular-weight heparin derivative on the nitric oxide levels and apoptotic DNA damage in adriamycin-induced cardiac and renal toxicity. *Toxicology*. 2006;
144. Deman A, Ceyssens B, Pauwels M, Zhang J, et al. Altered antioxidant defence in a mouse adriamycin model of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;
145. El-Shitany NA, El-Haggag S, El-desoky K. Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 2008;
146. Sternberg SS, Philips FS, Cronin AP. Renal Tumors and Other Lesions in Rats Following a Single Intravenous Injection of Daunomycin1. *Cancer Res*. 1972;
147. Bertani T, Rocchi G, Sacchi G, Mecca G, et al. Adriamycin-Induced Glomerulosclerosis in the Rat. *Am J Kidney Dis*. 1986;
148. Bertani T, Cutillo F, Zoja C, Broggin M, et al. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int*. 1986;
149. Park JC, Hong YS, Joo Kim Y, Yang JY, et al. A metabonomic study on the biochemical effects of doxorubicin in rats using ¹H-NMR spectroscopy. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues*. 2009;
150. Husain S, Ginawi I, Bashir AI, Kfoury H, et al. Focal and segmental glomerulosclerosis in murine models: a histological and ultrastructural characterization with immunohistochemistry correlation of glomerular CD44 and WT1 expression. *Ultrastruct Pathol*. 2018;
151. Motawi TMK, Sadik NAH, Refaat A. Cytoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: An experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder. *Food Chem Toxicol*. 2010;
152. Newbold KM, Howie AJ, Girling AJ, Kizaki T, et al. A simple method for assessment of glomerular size and its use in the study of kidneys in acromegaly and compensatory renal enlargement. *J Pathol*. 1989;
153. Newbold KM, Howie AJ, Koram A, Adu D, et al. Assessment of glomerular size in renal biopsies including minimal change nephropathy and single kidneys. *J Pathol*. 1990;
154. Güray M, Sarioglu S, Türkmen M, Yilmaz O, et al. Cyclosporine a toxicity in association with reduced renal mass. *Transplant Proc*. 2003;
155. Kasap B, Türkmen M, Sarioğlu S, Sis B, et al. The relation of IgM deposition to clinical parameters and histomorphometry in childhood mesangial proliferative glomerulonephritis. *Pathol Res Pract*. 2008;
156. Period N, Detcheva A, Khalil EI, Remuzzi G. Cyclosporine induces glomerulosclerosis: Three-dimensional definition of the lesions in a rat model of renal transplant. *Kidney Int*. 1996;

157. Schiller B, Moran J. Focal glomerulosclerosis in the remnant kidney model - An inflammatory disease mediated by cytokines. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;
158. Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int*. 1984;
159. Maric C, Sandberg K, Hinojosa-Laborde C. Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17 β -estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat. *J Am Soc Nephrol*. 2004;
160. Kim DR, Lee SY, Kim JS, Kim YG, et al. Ameliorating effect of gemigliptin on renal injury in murine adriamycin-induced nephropathy. *Biomed Res Int*. 2017;
161. Howie AJ, Ferreira MAS, Adu D. Prognostic value of simple measurement of chronic damage in renal biopsy specimens. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;
162. Bertani T, Ferrazzi P, Schieppati A, Ruggenti P, et al. Nature and extent of glomerular injury induced by cyclosporine in heart transplant patients. *Kidney Int*. 1991;
163. Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant*. 2017;
164. Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *New England Journal of Medicine*. 2002.
165. Kerr H, Richards A. Complement-mediated injury and protection of endothelium: Lessons from atypical haemolytic uraemic syndrome. *Immunobiology*. 2012.
166. George JN, Nester CM. Syndromes of thrombotic microangiopathy. *New England Journal of Medicine*. 2014.
167. Nester CM, Barbour T, de Cordoba SR, Dragon-Durey MA, et al. Atypical aHUS: State of the art. *Molecular Immunology*. 2015.
168. Brocklebank V, Wood KM, Kavanagh D. Thrombotic microangiopathy and the kidney. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;
169. Goodship THJ, Cook HT, Fakhouri F, Fervenza FC, et al. Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference. In: *Kidney International*. 2017.
170. Lusco MA, Fogo AB, Najafian B, Alpers CE. *AJKD Atlas of Renal Pathology: Thrombotic Microangiopathy*. *Am J Kidney Dis*. 2016;
171. Bailey E, Bottomley MJ, Westwell S, Pringle JH, et al. Vascular endothelial growth factor mRNA expression in minimal change, membranous, and diabetic nephropathy demonstrated by non-isotopic in situ hybridisation. *J Clin Pathol*. 1999;
172. Liu H, Gao X, Xu H, Feng C, et al. α -Actinin-4 is involved in the process by which dexamethasone protects actin cytoskeleton stabilization from adriamycin-induced

- podocyte injury. *Nephrology*. 2012;
173. Xing Y, Ding J, Fan Q, Guan N. Diversities of podocyte molecular changes induced by different antiproteinuria drugs. *Exp Biol Med*. 2006;
 174. Fan Q, Xing Y, Ding J, Guan N. Reduction in VEGF protein and phosphorylated nephrin associated with proteinuria in adriamycin nephropathy rats. *Nephron - Exp Nephrol*. 2009;
 175. Wang L, Flannery PJ, Spurney RF. Characterization of angiotensin II-receptor subtypes in podocytes. *J Lab Clin Med*. 2003;
 176. Matsusaka T, Asano T, Niimura F, Kinomura M, et al. Angiotensin receptor blocker protection against podocyte-induced sclerosis is podocyte angiotensin II type 1 receptor-independent. *Hypertension*. 2010;
 177. Remuzzi A, Fassi A, Bertani T, Perico N, et al. ACE inhibition induces regression of proteinuria and halts progression of renal damage in a genetic model of progressive nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 1999;
 178. Remuzzi A, Gagliardini E, Sangalli F, Bonomelli M, et al. ACE inhibition reduces glomerulosclerosis and regenerates glomerular tissue in a model of progressive renal disease. *Kidney Int*. 2006;
 179. Macconi D, Sangalli F, Bonomelli M, Conti S, et al. Podocyte repopulation contributes to regression of glomerular injury induced by ace inhibition. *Am J Pathol*. 2009;
 180. Hickson LJ, Gera M, Amer H, Iqbal CW, et al. Kidney transplantation for primary focal segmental glomerulosclerosis: Outcomes and response to therapy for recurrence. *Transplantation*. 2009;
 181. Salama AD, Pusey CD. Drug insight: Rituximab in renal disease and transplantation. *Nature Clinical Practice Nephrology*. 2006.
 182. Fornoni A, Sageshima J, Wei C, Merscher-Gomez S, et al. Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Sci Transl Med*. 2011;
 183. Nakazawa Y, Nishino T, Obata Y, Nakazawa M, et al. Recombinant human erythropoietin attenuates renal tubulointerstitial injury in murine adriamycin-induced nephropathy. *J Nephrol*. 2013;
 184. Shivakumar P, Usha Rani M, Gopala Reddy A, Anjaneyulu Y. A study on the toxic effects of doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicol Int*. 2012;
 185. Oktem G, Ayla S, Seckin I, Tanriverdi G, et al. Doxorubicin induced nephrotoxicity: Protective effect of nicotinamide. *Int J Cell Biol*. 2011;
 186. Cormack-Aboud FC, Brinkkoetter PT, Pippin JW, Shankland SJ, et al. Rosuvastatin protects against podocyte apoptosis in vitro. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;
 187. Vaughan MR, Pippin JW, Griffin S V., Krofft R, et al. ATRA induces podocyte differentiation and alters nephrin and podocin expression in vitro and in vivo. *Kidney*

- Int. 2005;
188. De Petris L, Hruska KA, Chiechio S, Liapis H. Bone morphogenetic protein-7 delays podocyte injury due to high glucose. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;
 189. Berg AL, Nilsson-Ehle P, Arnadottir M. Beneficial effects of ACTH on the serum lipoprotein profile and glomerular function in patients with membranous nephropathy. In: *Kidney International*. 1999.
 190. Lindskog A, Ebefors K, Johansson ME, Stefánsson B, et al. Melanocortin 1 receptor agonists reduce proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 2010;
 191. Si J, Ge Y, Zhuang S, Juan Wang L, et al. Adrenocorticotrophic hormone ameliorates acute kidney injury by steroidogenic-dependent and-independent mechanisms. *Kidney Int*. 2013;
 192. Yao H, Cai ZY, Sheng ZX. NAC attenuates adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats through regulating TLR4 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;
 193. Baroni EA, Costa RS, Da Silva CGA, Coimbra TM. Heparin treatment reduces glomerular injury in rats with adriamycin-induced Nephropathy but does not modify tubulointerstitial damage or the renal production of transforming growth factor-beta. *Nephron*. 2000;
 194. Deepa PR, Varalakshmi P. The cytoprotective role of a low-molecular-weight heparin fragment studied in an experimental model of glomerulotoxicity. *Eur J Pharmacol*. 2003;
 195. Rao C V., Newmark HL, Reddy BS. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*. 1998;
 196. Smith TJ, Yang GY, Seril DN, Liao J, et al. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis*. 1998;
 197. Desai KN, Wei H, Lamartiniere CA. The preventive and therapeutic potential of the squalene-containing compound, Roindex, on tumor promotion and regression. *Cancer Lett*. 1996;
 198. Sotiroudis TG, Kyrtopoulos SA. Anticarcinogenic compounds of olive oil and related biomarkers. *European Journal of Nutrition*. 2008.
 199. Senthilkumar S, Yogeeta SK, Subashini R, Devaki T. Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats. *Chem Biol Interact*. 2006;
 200. Senthilkumar S, Devaki T, Manohar BM, Babu MS. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clin Chim Acta*. 2006;
 201. Deepa PR, Varalakshmi P. Beneficial cardio-renal effects of a low-molecular-weight heparin-derivative on adriamycin-induced glycosaminoglycanuria and tissue lipid abnormalities. *Toxicology*. 2005;

202. Javaid B, Olson JL, Meyer TW. Glomerular injury and tubular loss in adriamycin nephrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2001;
203. Zima T, Tesař V, Crkovská J, Stejskalová A, et al. ICRF-187 (dexrazoxan) protects from adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;
204. Ajith TA, Aswathy MS, Hema U. Protective effect of *Zingiber officinale roscoe* against anticancer drug doxorubicin-induced acute nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2008;
205. Zan J feng, Shen C juan, Zhang L ping, Liu Y wen. Effect of *Poria cocos* hydroethanolic extract on treating adriamycin-induced rat model of nephrotic syndrome. *Chin J Integr Med*. 2017;
206. Ji Z, Huang C, Liang C, Chen B, et al. Protective effects of blocking renin-angiotensin system on the progression of renal injury in glomerulosclerosis. *Cell Mol Immunol*. 2005;
207. Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, et al. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int*. 1986;
208. Thomas DB. Focal segmental glomerulosclerosis a morphologic diagnosis in evolution. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2009.
209. Barisoni L, Kriz W, Mundel P, D'Agati V. The dysregulated podocyte phenotype: A novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV- associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 1999;
210. Sanden SK, Wiggins JE, Goyal M, Riggs LK, et al. Evaluation of a thick and thin section method for estimation of podocyte number, glomerular volume, and glomerular volume per podocyte in rat kidney with Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte nuclear marker. *J Am Soc Nephrol*. 2003;
211. Suzuki J, Yoshikawa N, Nakamura H. A quantitative analysis of the glomeruli in focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*. 1994;
212. Kasiske BL, Umen AJ. The influence of age, sex, race, and body habitus on kidney weight in humans. *Arch Pathol Lab Med*. 1986;
213. Abdi R, Slakey D, Kittur D, Racusen LC. Heterogeneity of glomerular size in normal donor kidneys: Impact of race. *Am J Kidney Dis*. 1998;
214. Abdi R, Slakey D, Kittur D, Burdick J, et al. Baseline glomerular size as a predictor of function in human renal transplantation. *Transplantation*. 1998;
215. Sasaki T, Tsuboi N, Haruhara K, Okabayashi Y, et al. Bowman Capsule Volume and Related Factors in Adults With Normal Renal Function. *Kidney Int Reports*. 2018;
216. Al-Nouri ZL, Reese JA, Terrell DR, Vesely SK, et al. Drug-induced thrombotic microangiopathy: A systematic review of published reports. *Blood*. 2015;
217. Viero RM, Soares VA. The hemolytic uremic syndrome as a complication of adriamycin nephropathy. *Ren Fail*. 1998;

218. Mergenthaler HG, Binsack TH, Wilmanns W. Carcinoma-associated hemolytic-uremic syndrome in a patient receiving 5-fluorouracil-adriamycin-mitomycin C combination chemotherapy. *Oncol.* 1988;
219. Kambhu SA, Kelsen DP, Fiore J, Niedzwiecki D, et al. Metastatic adenocarcinomas of unknown primary site. Prognostic variables and treatment results. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials.* 1990;
220. Shavit L, Lifschitz MD, Gabizon A, Kwa M, et al. Pegylated liposomal doxorubicin and renal thrombotic microangiopathy: An under-recognized complication of prolonged treatment for ovarian cancer. *Kidney International.* 2014.

8. EKLER:

Ek 1: DEÜ Multidisipliner Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onay Formu

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 07/12/2017
Toplantı Tarihi : 13 Haziran 2017

Sayın, Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU
DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığı

31/2017 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Farklı Kaynaklı Squalen'in İn Vitro ve İn Vivo Podosit Hasarı Üzerine Etkisi" isimli, Resmiye Irmak Yüzügüldü, Yavuz Oktay, Osman Yılmaz, Mehtap Ünlü, Ayça Erşen Danyeli, Caner Çavdar, Hülya Güven, Hatice Efsun Kolatan, Hülya Ellidokuz'un araştırmacı olduğu, 51 adet Wistar erkek sıçan talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı
(Araştırmacı)

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr.Gülşün OKTAY
Üye(Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Prof.Dr.Nergis DÜRMÜŞ
Üye

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Z. Kinan
Zehra KINAM
Üye

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye

Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMÇİ
Üye (Topl.Katılmadı)

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

Ek 2: SQ-Z saflık oranını gösterir kromotografi sonucu

Analysis Certificate for **SQUALENE**

Importer / Buyer

: 9 EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ TIBBİ
PATOLOJİ ANA BİLİM DALI

Dr. Resmiye İmrek Yüzüğüldü

Exporter / Vendor

: 4K KİMYA SANAYİ VE TİCARET A.Ş.
Cumhuriyet Bulvarı Elcin Apartmanı
No: 118 K:5 D:10 Alsancak Konak / İZMİR

Producer

: 4K KİMYA SANAYİ VE TİCARET A.Ş.
Cumhuriyet Bulvarı Elcin Apartmanı
No: 118 K:5 D:10 Alsancak Konak / İZMİR

Sample Code

: 8057

ANALYSIS RESULTS

Appearance
Colour
Odor
Specific gravity (at 20 C)
Refractive Index (at 20 C)

Free Acidity
Iodine Value
Peroxide value (mleqgO/kg)
Unsaponifiable matter (%)
Saponification value (mg KOH/g)
Content (Purity) (%)

: Clear
: Yellow
: Typical-slight
: 0,858
: 1,4968

: 0,05
: 361
: 1,10
: 98,10
: 0,98
: 96,56

Method	Time	Space
Multiplication	1.0000	1.0000
Division	1.0000	1.0000
Use Multiplication & Division Factors with 12800	1.0000	1.0000

Plant #	Co. Type	Type	Width (in)	Area (sq ft)	Height (in)	Area (sq ft)
1	11-600	W	1.0040	812.4320	11.7025	9.1160
2	15-170	W	1.0039	349.8637	11.4490	9.5115
3	20-700	W	0.9982	785.7713	12.1400	9.1150
4	22-000	W	2.0520	870.4800	10.0000	9.0000
5	30-200	W	0.9991	612.9910	10.0000	1.0000
6	20-700	W	1.0000	8.1000	10.0000	9.1160
7	30-200	W	0.9991	612.9910	10.0000	9.1160
8	34-100	W	0.9992	200.4520	10.0000	9.1160
9	24-100	W	0.9991	300.4520	10.0000	9.1160
10	30-200	W	0.9991	612.9910	10.0000	9.1160
11	15-170	W	0.9992	349.8637	11.4490	9.1160
12	15-170	W	0.9992	349.8637	11.4490	9.1160

Abstract