

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

FOKAL SEGMENTAL GLOMERÜLOSKLEROZ VE MİNİMAL
DEĞİŞİKLİK HASTALIĞINDA PODOSİT İLİŞKİLİ PROTEİNLER İLE
TGF-BETA-1, WT-1 EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ,
HİSTOLOJİK VE KLİNİK BULGULARLA KORELASYONU

UZMANLIK TEZİ
DR. HAYRİYE TATLI DOĞAN

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. LEYLA MEMİŞ

Ankara, 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**FOKAL SEGMENTAL GLOMERÜLOSKLEROZ VE MİNİMAL
DEĞİŞİKLİK HASTALIĞINDA PODOSİT İLİŞKİLİ PROTEİNLER İLE
TGF-BETA-1, WT-1 EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ,
HİSTOLOJİK VE KLİNİK BULGULARLA KORELASYONU**

UZMANLIK TEZİ
DR. HAYRİYE TATLI DOĞAN

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. LEYLA MEMİŞ

Ankara, 2008

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi, deneyim ve destekleri ile eğitimimde büyük katkıları olan tez danışmanım Prof. Dr. Leyla Memiş ve değerli hocalarım başta Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülen Akyol olmak üzere Prof. Dr. Ömer Uluoğlu, Prof. Dr. Ömür Ataoğlu, Prof. Dr. Ayşe Dursun, Doç. Dr. Aylar Poyraz, Doç. Dr. Nalan Akyürek, Doç. Dr. Özlem Erdem, Yrd. Doç. Dr. Güldal Yılmaz, Yrd. Doç. Dr. Özgür Ekinci ve Yrd. Doç. Dr. Pınar Uyar Göçün'e, tezimi hazırlamamda yardımları nedeniyle Yrd. Doç. Dr. İpek Işık Gönül'e, araştırma bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde katkıları nedeniyle Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Nur Aksakal'a, birlikte çalışmaktan zevk duyduğum araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tezimin teknik kısmında yardımcı olan tüm laboratuvar personeline en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Hayriye TATLI DOĞAN

ANKARA, 2008

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	33
BULGULAR.....	37
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
ÖZET	77
SUMMARY	78
KAYNAKLAR	80

GİRİŞ

Fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS) ve minimal değişiklik hastalığı(MDH) proteinüri ve ödem, hipoalbuminemi gibi nefrotik sendromun diğer bulguları ile presante olan, renal biyopsi ile tanı alan histopatolojik antitelerdir (34). Benzer klinik bulguları olması ve kortikosteroid, alkile ajanlar, kalsinörin antagonistleri ile olan benzer tedavi yaklaşımlarının her iki hastalıkta da etkili olmaları nedeniyle tek bir hastalığın iki farklı alt tipi ya da aynı spektrumun farklı iki ucunda bulunan antiteler olabileceği yönünde görüşler mevcuttur (46). MDH ve FSGS’da genetik, immünolojik, hemodinamik ya da dolaşımda bulunduğu düşünülen bazı permeabilite faktörleri ve lenfokinler gibi benzer ve farklı etiyolojik nedenler üzerinde durulsa da etiyopatogenez net değildir. Yine FSGS, MDH’a göre daha çok progresyon gösterme eğilimindedir, tedaviye yanıt oranları daha düşüktür. Dolayısıyla bu iki grup hastalık farklı antiteler olabilir. FSGS’yi MDH’dan ayıran en önemli özellik podosit zedelenmesinin daha ciddi ve sıklıkla geri dönüşümsüz olmasıdır. Glomerül epitel zedelenmesinin temel olduğu bu iki önemli hastalık podositopatiler çatısı altında yer alırlar. Bu nedenle son yıllarda podosit biyolojisi, fonksiyonları ve podosit zedelenmesine neden olabilen gen mutasyonları, glomerüler epitelyal hücre zedelenme mekanizmaları üzerinde sıkça durulmuştur.

Podosit zedelenmesinin belirlenmesi ve yaygınlığı tanı, hastalığın aktivitesi ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesi aşamalarında faydalı olabilmektedir. Yine podositopatiler grubunda Fin tipi konjenital nefrotik sendromda saptanan slit diyafram proteinlerinden nefrin gen mutasyonunun podosit ayaksı çıkıntılarda silinmeye ve zedelenmeye neden olduğunun gösterilmesi ile idiyopatik nefrotik sendromlarda da slit diyafram proteinlerine ilişkin genetik mutasyonların ve protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi önem kazanmıştır. Slit diyafram protein ekspresyonunu immunhistokimyasal olarak değerlendirdiğimiz bu çalışmamızın

amacı da etiyopatogeneze çok histopatolojik, immunhistokimyasal, elektron mikroskopik bulguların eşliğinde morfolojik analiz ve korelasyon yöntemi ile ayırıcı tanıya destek sağlamak, diğer taraftan morfolojik ve laboratuvar bulguların korelasyonu ile hastalığın ciddiyetini belirleyen parametreleri saptamaktır. Ayrıca MDH ‘dan farklı olarak mezangial proliferasyon gösteren olguların FSGS ve MDH arasındaki spektrumdaki yerini ve podosit zedelenmesinin derecesini belirlemek amacıyla bu olgular da çalışmaya alınmıştır. Bu çalışmada değerlendirilen üç önemli slit diyafram proteini olan nefrin, podosin ve sinaptopodin ekspresyon paterni karşılaştırılarak bulguların genetik mutasyon, fonksiyonel, yapısal bozukluk ya da yeniden dağılım gibi mekanizmalardan hangilerini yansıtabileceği üzerinde durulmuştur.

Çalışmanın bir diğer yönü progresyon göstergelerinden olan podosit kaybı ve skleroz gelişiminde TGF beta 1’in rolünü ortaya koymak, yine podosit kaybını ve gruplar arası farklılığı belirlemek amacıyla WT 1 ekspresyonunda azalmayı , podosit fenotip değişikliği ve göstergelerini değerlendirmektir.

GENEL BİLGİLER

Böbrek hastalıkları içerisinde glomerüler hastalıklar önemli yer tutmaktadır. Hipertansiyon, diyabetes mellitus, sistemik lupus eritematozus gibi sistemik hastalıklar yanı sıra primer glomerülonefritler de glomerüler zedelenmeye yol açan önemli hastalıklardır. Nefrotik sendrom primer ve sekonder glomerüler hastalıklar spektrumu ile ilişkili olan proteinüri, ödem, hipoalbuminemi, hiperlipidemi kapsayan bir antitedir. Nefrotik düzeyde proteinüri 1,73 metrekare yüzey alanı için günlük 3.5 gr ve üzeri protein kaybıdır. Nefrotik sendromun farklı nedenleri açısından ayırım yapmak önemlidir.

Proteinüri hem klinik prognostik faktör olarak hem de progresif renal fonksiyon kaybını öngörebilme açısından oldukça önemlidir. Her bir böbrek yaklaşık bir milyon glomerül içermekte olup suda çözünen plazma artık ürünleri glomerüler filtrasyon yolu ile elimine olurken makromoleküller ve albüminin eliminasyonu filtrasyon bariyeri tarafından engellenmektedir. Bu nedenle glomerüler filtrasyon bariyerindeki bozuklukların proteinüri ile neticelenmesi kaçınılmazdır. Plazma protein kaybına neden olan filtrasyon bariyerindeki moleküler değişikliklerin ya da bu değişikliklere neden olan olayların belirlenmesi önem kazanmaktadır.

Proteinüri glomerüler hastalıkların en sık görülen klinik yansıması olduğundan son yıllarda proteinürinin altta yatan mekanizmalarını anlayabilmek için önemli adımlar atılmış ve glomerüler kapiller duvarın moleküler yapısı, genetiği ve biyolojisine yönelik bilgiler edinilmeye başlanmıştır (2).

Glomerüler filtrasyon bariyeri: Böbreğin kortikal tabakasındaki organize kapiller ağ glomerülleri oluşturarak plazmanın ilk filtrasyon görevini yapmaktadır. Bu sayede günlük 180 lt primer idrar üretimi gerçekleşir. Bu ultrafiltrat daha sonra tübüler sistemden geçerek farklı domain'lere ayrılır. Primer idrar pulsatil kan basıncı sayesinde filtrasyon bariyerinden bowman kapsülüne geçer. Glomerüler filtrasyonu etkileyen faktörler moleküllerin boyut, şekil ve elektriksel yük özellikleri, hemodinamik faktörler ve kapiller duvar özellikleridir. Glomerüler filtrasyon bariyeri luminal yüzden dışa doğru negatif yüklü glikokaliks mantoya sahip fenestre kapiller endotel, glomerüler bazal membran ve visseral epitel hücreleri olan podositlerden oluşur (34).

Kapiller endotel 70-100nm çapında porlara sahiptir. Podosit kaynaklı vasküler endotelyal büyüme faktörü endotelin gelişiminde ve fenestraların oluşumunda önemlidir. Endotel hücreleri negatif yüklü sialoproteinler ve proteoglikanlar içeren glikokaliks mantoya sahiptir. Endoteldeki bu anyonik yük de filtrasyonda önem taşımaktadır (34).

Bazal membran lamina rara eksterna, lamina densa ve lamina rara interna olmak üzere 3 tabakadan oluşan 300-350nm kalınlıkta kapiller duvarı destekleyen bir yapıdır. Glomerüler bazal membranda mevcut tip 4 kollajen diğer komponentlere çatı oluşturan 3 boyutlu yapıdadır. Kollajen yanı sıra proteoglikan, nidojen ve laminin de içerir. Glomerüler bazal membranın anyonik yükünde heparan sülfatlı proteoglikanlar oldukça önemlidir. Ancak bazal membrandaki anyonik yükün tek başına filtrasyon için yeterli miktarda olmadığı bilinmektedir. Bazal membrandaki heparan sülfat yapısında bulunan perlekan ve agrin kaybının proteinüriye neden olmadığı deneysel olarak gösterilmiştir. Laminin bazal membranda bulunan hücresel diferansiasyon ve adezyonda görevi olan heterotrimerik bir proteindir. Tip 4 kollajen ve proteoglikanlar makromoleküllerin geçişine engel teşkil etmekte iken laminin filtrasyonda rol almaktadır. Laminin gen mutasyonunun letal form konjenital

nefrotik sendroma neden olduğu ortaya koyulmuştur. Laminin kollajen matrikse entaktin (nidojen) ile bağlanır ve alfa 3 beta 1 integrin yolu ile epitelyal ve endotelyal hücrelere tutunur (78).

Slit diyafram filtrasyonun üçüncü ve moleküllerin boyutu ile ilişkili geçirgenliğin en önemli basamağını oluşturur (6,80). Komşu podosit ayaksı çıkıntıları arası mesafe filtrasyon poru olarak ve bunları birbirine bağlayan ince membranöz yapı slit diyafram olarak isimlendirilmektedir.

Podositler glomerüler yapının en büyük ve en kompleks hücresel organizasyona sahip hücreleridirler. Kapiller ağı dışarıdan örterek üriner boşluğa doğru uzanırlar (57,76).

Podositler hücre gövdesi, majör uzantılar ve ayaksı çıkıntılar olmak üzere yapısal ve fonksiyonel olarak üç segment ile karakterlidir (54). Hücre gövdeleri ve majör uzantılar bazal membrana direk olarak bağlı değildir , hücre gövdesi ve ayaksı çıkıntılar arasında boşluk bırakarak bowman mesafesinde yüzer tarzda bulunurlar ve esas olarak ayaksı çıkıntılar ile bazal membrana tutunurlar. Ayaksı çıkıntılar podosit fonksiyonu açısından temel yapılar olup mikroflamanlardan zengin kontraktıl sisteme sahiptir. Bu sistem aktin, myozin, alfa aktinin, talin ve vinkulin içerir. Aktin demetleri aynı podositteki ayaksı çıkıntılar arasında köprüler oluşturarak majör uzantılardaki mikrotübüllere bağlanır. Ayaksı çıkıntıların apikal alan, slit diyafram protein alanı ve bazal membran alanı olmak üzere üç kısmı tanımlanmıştır (54).

Bütün kompartmanlardaki submembranöz alanlar aktin hücre iskeleti ile bağlantılıdır. Apikal kısımda bulunan podokaliksin ezrin ve sodyum –hidrojen değişimi düzenleyici faktör 2 (NHERF 2) aracılığı ile aktine bağlanırken ,glomerüler bazal membran ile aktin flamanlar arası bağlantı bazalde bulunan alfa 3 beta 1 integrin ve distroglikan kompleksi aracılığı ile sağlanır (41). Podosit proteinlerinden podokaliksin, podoplanin ve glomerüler epitelyal protein 1 (GLEEP 1) ayaksı çıkıntıların elektrik yükler aracılığı ile birbirleri ile iç içe geçmiş

tarzda ancak aralıklı kalmalarına yardımcı olur. Sinaptopodin prolinden zengin bir proteindir ve alfa aktinin 4 gibi sıkı bağlantı proteini olan MAGI 1 ile etkileşir (34).

Komşu podosit ayakları çıkıntıları birbiri ile iç içe geçmiş tarak benzeri yapı şeklindedir ve 35-45 nm'lik filtrasyon poru denen dar yarıklarla ayrılmışlardır. Slit diyafram adı verilen ince membranöz yapı bu yarıkları köprüleştirir. Slit diyafram elektron mikroskopik inceleme ile Rodewal ve Karnowsky tarafından hücre membranlarına paralel olarak uzanım gösteren ince çubuk benzeri yapıların bir araya gelmesi ile fermuar benzeri model olarak tanımlanmıştır (33). Daha sonraları elektron tomografik çalışmalarda Wartiovaara ve Oqvist tarafından bu yapının organize sarmal şeklinde bir ağ olduğu saptanmıştır (54). Slit diyafram intraglomerüler basınç değişikliği durumunda podositlere elastikiyet sağlamada ve podositleri apikal ve bazolateral kısımlara ayırarak fonksiyonel ve organeller açısından hücre polarite kazandırmada da etkilidir.

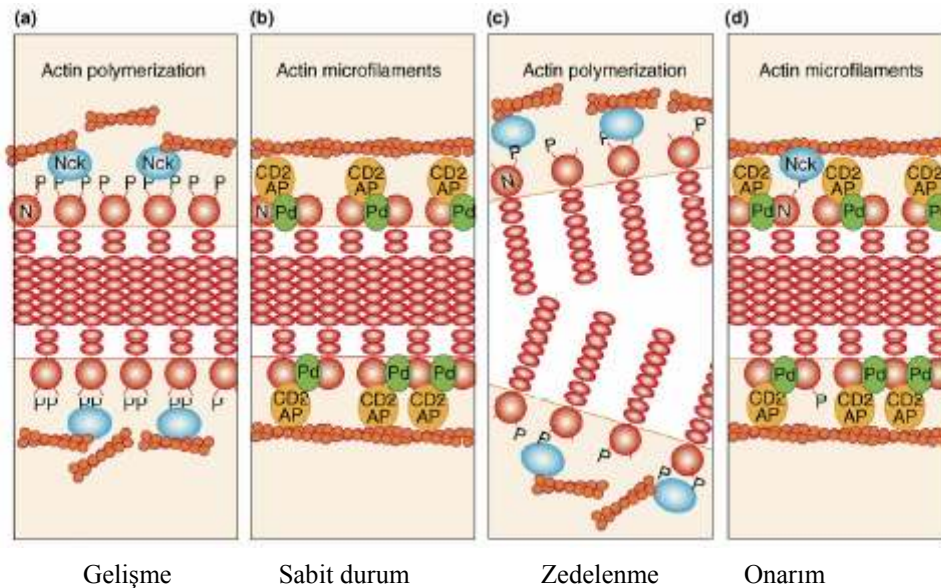
Slit diyafram ilişkili proteinler nefrin, podosin, CD 2AP, P-kaderin, NepH 1 ve FAT 1'dir (27). Bu proteinler ayaklı çıkıntıların şeklinin korunmasında önemli olduğu gibi sinyal yollarında, endositoz, hücre diferansiasyonunda, podosit viabilitesi ve bazal membrana yönelik heparan sülfat üretiminde de yer almaktadır. Slit diyaframın seçici geçirgenlikteki yerinin önem kazanmasıyla bu yapıdaki genetik anomalilerin ve slit diyaframı oluşturan moleküllerin saptanma aşaması başlamıştır.

Nefrin: 1998'de ve Tryggvason tarafından nefrini kodlayan NPHS1 gen mutasyonunun Fin tipi konjenital nefrotik sendroma neden olduğu saptanmıştır (79).

Nefrin kısa intraselüler domain, transmembran domain ve distal 8 adet immunglobulin G benzeri domain ve proksimalde fibronektin içeren ekstraselüler domain içeren bir transmembran proteindir. Ekstraselüler domain 35nm olup komşu ayaklı çıkıntılardaki nefrin molekülleri karşılıklı etkileşerek filtrasyon alanını oluşturur (28,78). Nefrin oligomerleri

ayaksı çıkıntılarının hücre membranındaki sinyal mikrodomanleri olan kolesterol ve sifingolipidlerden zengin lipid raftlarla etkileşir. Nefrin molekülünün intraselüler kısmında fosforilasyon açısından hedef olan tirozin rezidüleri bulunur. Gelişim aşamasında ayaksı çıkıntılar oluşurken nefrin Nck adaptör proteini yolu ile fosforile olur ve bu sayede aktin polimerizasyonu gerçekleşir. Slit diyafram geliştikçe nefrin defosforile olarak aktin iskelete CD2AP ve podosin proteinleri aracılığı ile bağlanır. Podosit zedelenmesi durumunda yine hızlı aktin polimerizasyonu ve sitoskeletal reorganizasyon gerektiğinden Nck proteinlerinde artış, nefrin fosforilasyon ve aktin repolimerizasyonu gerçekleşir. Tamir sürecinde nefrin defosforile olarak aktine yine CD2AP ve podosin aracılığı ile bağlanır (56) .

Şekil I: Nefrin ve ayaksı çıkıntı proteinleri ile aktin hücre iskeleti arasındaki ilişki



Podosin: Slit diyaframın başlangıç noktasında podosit ayaksı çıkıntısının membranında lokalizedir, nefrinin sitoplazmik kısmı ve CD2AP'e bağlanır. Bu kompleksin stabilizasyonunda, nefrinin hücre iskeletine bağlanmasında ve nefrinin endoplazmik

retikulumdan hücre membranına taşınmasında görev alır (54). Ayrıca lipid raft içerisinde oligomer ve dimerler oluşturarak sinyal fonksiyonunda da yer alır (31). Podosini kodlayan gen (NPHS 2) kromozom 1q25-31'de lokalizedir (78).

CD2AP: İlk olarak T lenfositlerin CD2 reseptörlerinde tespit edilmiş B ve T hücreleri arası immünolojik sinapsları düzenleyen bir adaptör proteindir. Daha sonraları podositlerde, proksimal ve distal tübüllerde, toplayıcı duktuslarda da ekspresyonu saptanmıştır. Nefrinin aktine bağlanmasında aracılık eder (56).

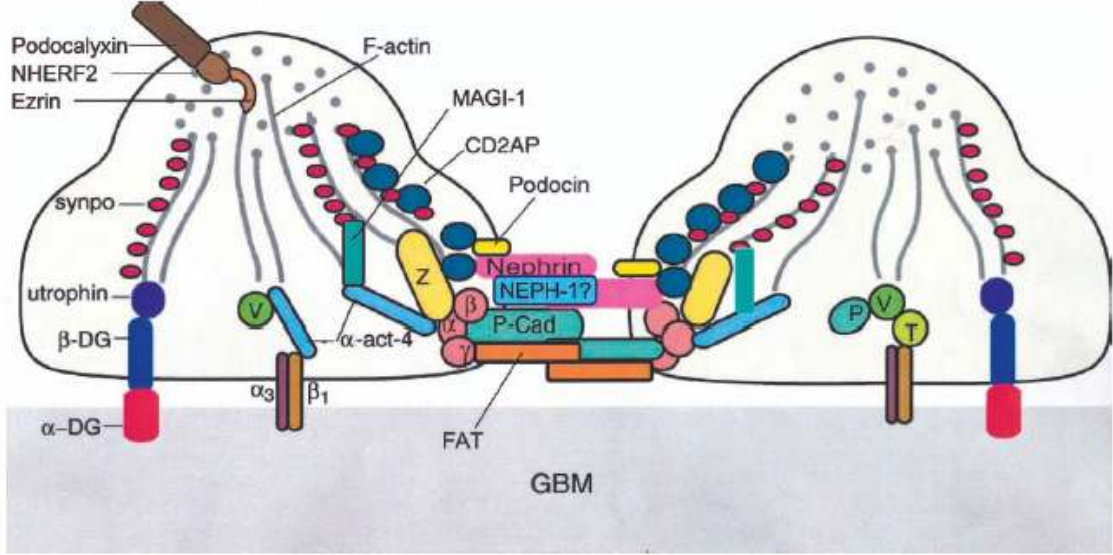
ZO-1 (zonula occludens 1): Podositlerde tübül epitel hücrelerinde ve endotelde eksprese olan bir membran proteini olup tıpkı podosin gibi slit diyafram ve ayaksı çıkıntıların birleşme bölgesinde lokalizedir. Neph 1 ve aktin hücre iskeleti ile ilişkilidir (56).

Neph 1: Beş adet immunglobulin içeren slit diyaframda lokalize ekstraselüler domain ve intraselüler domain içeren transmembran proteindir. Ekstraselüler domain nefrin ile etkileşirken intraselüler domain podosin ve ZO-1 ile etkileşir (3).

FAT 1: Kaderin, epidermal büyüme faktörü ve laminin domainleri içeren ekstraselüler domain ve beta katenin bağlayıcı sitoplazmik domain içeren protokaderin molekülüdür. P-kaderin ile birlikte hücre adezyonunda etkili olduğu gibi aynı zamanda ekstraselüler boşluğun sağlanmasında da önemi vardır (3).

Podositlerin üç boyutlu yapısının sağlanmasında ve glomerüler filtrasyonda rolü olan bu moleküllerin identifikasyonu gerek glomerüler fizyolojinin aydınlatılması gerekse proteinürik hastalıkların mekanizmalarının belirlenmesi açısından son yıllarda oldukça önem kazanmıştır (33).

Şekil II: Podosit ilişkili proteinler ve slit diyafram molekülleri



Proteinüri ve ayaksı çıkıntılarda silinmenin mekanizmaları:

Proteinüri tübüler sıvıda protein artışı, tübüler emilimde değişkenlik ve glomerüler filtrasyon bozukluğu sonucu meydana gelir. Glomerüler hastalıklar ilk ortaya çıkışında nefrotik sendrom ile presante olmakta ve glomerüler hastalığın mekanizması önem kazanmaktadır (2). Daha önceleri glomerüler bazal membran yapısındaki değişiklikler ve ayaksı çıkıntıların bazal membrandan ayrışması proteinürinin temel nedeni olarak kabul görmüştür. Bazal membrandaki heparan sülfat ya da proteoglikanlardaki defekt sonucu ya da antikorlar aracılığı ile anyonik sahaların maskelenmesi gibi değişiklikler sonucu ortaya çıkan elektriksel yük kaybının permeabilite artışında primer olduğu öne sürülse de bu olayların proteinüriye sekonder gelişmiş olabileceği de ekarte edilememektedir. Elektron mikroskopik incelemelerde izlenen ayaksı çıkıntılarda silinme epitelyal hasara sekonder bu uzantıların hücre gövdesine doğru retraksiyonu sonucu meydana gelmektedir. Epitelyal incelme ve erozyon sonucunda üriner boşluk ile direk temasa geçen bazal membrandan protein kaybı kaçınılmazdır (33).

1998 yılında Kestila ve arkadaşlarının Fin tipi konjenital nefrotik sendroma ilişkin nefrini kodlayan NPHS1 geninin bulunması ile proteinürinin patogenezeine yönelik önemli bir adım atılmıştır (44). Konjenital nefrotik sendrom intrauterin dönemde proteinüri ile başlayan ve doğumdan sonra da ciddi proteinürinin eşlik ettiği nefrotik sendromla seyreden otozomal resesif bir hastalıktır. Deneysel hayvan modellerinde de nefrin eksikliğinin masif proteinüri ile sonuçlandığı gösterilmiştir (15). Glomerül bazal membranını kodlayan genetik defektlerin daha sinsi bir proteinüri şeklinde klinik yansıması olduğundan slit diyaframın seçici geçirgenlikteki rolü diğer komponentlere göre üstündür. Podosit zedelenmesi, fokal segmental glomerüloskleroz, minimal değişiklik hastalığı, membranöz glomerülonefrit, lupus nefriti ve diyabet gibi glomerüler hastalıklarda görülmektedir. Altta yatan hastalığa bağlı olmaksızın erken dönemde morfoloji değişmezken, slit diyaframın moleküler yapısında değişiklikler olmaktadır. Elektron mikroskopik incelemede ayaksı çıkıntılarda inceltme, epitelyal vakuolizasyon, sıkı bağlantı formasyonu, epitelyal yarıklarda azalma ve yer yer epitelde bazal membrandan ayrışma saptanabilir. Ayaksı çıkıntılarda silinme ile proteinüri arasında bağlantı olduğu bilinmekle birlikte silinmenin mekanizması son yıllarda anlaşılmaya başlanmıştır. Podositlerin moleküler patolojisine dayanarak ayaksı çıkıntılarda silinme ve proteinürinin dört temel nedeni tanımlanmıştır (47).

- 1)Slit diyafram kompleksi ve lipid tabakası ile ilgili engeller
- 2)Glomerüler bazal membran ve podosit-bazal membran bağlantısı ile ilgili engeller
- 3)Aktin hücre iskeleti ve ilişkili protein alfa aktinin 4 ile ilgili engeller
- 4)Podosit apikal membranındaki negatif yükün nötralizasyonu ile ilişkili değişiklikler

Ayaksı çıkıntı hücre iskeleti:Hücre iskeletindeki majör moleküler komponentler, aktin, alfa aktinin ve sinaptopodindir. Alfa aktinin 4 aktine kovalan olarak bağlanır ve 19. kromozomda

lokalize ACTN 4 geninde heterozigot missense mutasyonu otozomal dominant form familial FSGS'a neden olur. Alfa aktinin hem bazal membrandaki integrinler hem de slit diyaframdaki beta- katenin molekülleri ile bağlantılı olduğundan ayaksı çıkıntılar bu farklı kısımları arasında bağlantıyı sağlar. Bu nedenle podosit zedelenmesinin nedeni ya da bölgesi ne olursa olsun ayaksı çıkıntılar silinmesinde aktin hücre iskeleti ortak yolu oluşturur. Nefrotik sendromda aktin hücre iskeletinde reorganizasyon ve ayaksı çıkıntılar bazal kısmına zıt olacak şekilde kondansasyon izlenir. Minimal değişiklik hastalığı gibi hafif formlarda sinaptopodin ekspresyonunda değişiklik saptanmazken, FSGS gibi daha ciddi hastalıklarda sinaptopodin ekspresyonunda azalma saptanmıştır. CD 80 B lenfositler ve antijen sunucu hücrelerde bulunan ancak podositlerde de izlenebilen transmembran molekülüdür. Reiser in vitro olarak bu moleküldeki artmış ekspresyonun da aktin flamanlarında reorganizasyona ve slit diyafram kaybına neden olduğunu göstermiştir

Slit diyafram komponentlerinde bozukluk ile ilişkili proteinüri: Slit diyafram proteinlerinden en önemlisi olan nefrinin ayaksı çıkıntılarda silinme üzerindeki rolü hayvan modellerinde antinefrin antikoru enjeksiyonu ya da NPHS 1 gen inaktivasyonu neticesinde proteinüri ve epitelyal silinmenin gözlenmesi ile ortaya konmuştur. Nefrin oligomerleri plazma membranındaki sinyal mikrodomanleri olan lipid tabakası ile ilişkilidir. İn vivo olarak podosit spesifik gangliozit enjeksiyonunda nefrin apikal kutba doğru yer değiştirir ve tirozin fosforilasyonu gerçekleşir. Nefrin molekülündeki tirozin rezidülerinin fosforilasyonu slit diyafram kaybına neden olan sinyalleri başlatmaktadır. Sonuçta slit diyaframda morfolojik değişiklikler, daralma ve epitelyal silinme kaçınılmazdır. Bu bulgular lipid tabakanın slit diyaframın organizasyonunda önemini göstermektedir.

NPHS2 gen mutasyonu otozomal resesif steroid dirençli nefrotik sendromda önemlidir, sporadik FSGS'a neden olabilir. NPHS1 gen ürünü podosin stomatin ailesinden, intraselüler N ve C terminali içeren integral membran proteindir. Stomatin eritrosit lipid tabakasında bulunur ve iskelet görevi görür. Podosin de benzer şekilde CD2AP ve nefrin ile etkileşerek slit diyafram yapısının stabilizasyonunda rol oynar.

FAT 1 yokluğunda da deneysel olarak slit diyafram kaybı ve ayaksı çıkıntılarda füzyona sekonder perinatal letalite saptanmıştır.

ZO-1 aktinle etkileştiğinden ve tirozin fosforilasyonu yolu ile sinyal iletiminde yeri olduğundan redistribüsyonunda spontan proteinüriye neden olabilmektedir.

Luminal membrandaki negatif yük kaybı: Luminal yüzdeki negatif yük büyük oranda podokaliksin tarafından sağlanır (8). Podokaliksin endotel ve podositler tarafından ayaksı çıkıntılar ve slit diyaframın gelişim aşamasında sentezlenir. Podokaliksin podositlerin hücresel yapısının oluşumu ve korunmasında kritik öneme sahiptir. Aynı zamanda paryetal hücrelerin podositlere adezyonunu engeller. Podokaliksin eksikliği immatür, yassı podositlerle sonuçlanmaktadır. Luminal membrandaki bir diğer önemli protein GLEPP-1 glomerüler basınç/filtrasyon oranını düzenlemektedir. MDH'ında bu moleküllerin ekspresyonunun korunduğu, ancak kollapsing glomerulopati ve FSGS'da podokaliksin ve GLEPP-1 ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır.

Glomerüler polianyonun deneysel olarak protamin infüzyonu ile nötralizasyonu (Seiler ve ark) ya da püromisinaminonükleozit nefropatisinde(PAN) polianyon kaybı proteinüri ve epitelyal silinme ile sonuçlanmıştır.

Glomerüler bazal membrana podosit adezyonunda engeller: Alfa 3 beta 1 integrin glomerüler bazal membran komponentlerinden tip 4 kollajen, laminin, fibronektin ve endaktine bağlanarak fokal adezyonlar oluşturur, aynı zamanda bu bağlantı intraselüler hücre iskeletini organize ederek podositlerin şeklinin korunmasında yer alır. Bu nedenle integrinlerin bağlantı bölgelerinin antikorlarla blokajı epitelyal silinme, proteinüri ve ayaksı çıkıntıların bazal membrandan ayrışmasına neden olur. Ağır proteinürinin başlangıcı sıklıkla epitelyal ayrışma ile birliktedir.

Distroglikan kompleksi ayaksı çıkıntıların bazal hücre membranında bulunmakta ve adezyonu bazal membrandaki matriks proteini ve podositteki aktin arası bağlantıyı sağlayarak gerçekleştirmektedir. Distroglikan aktine ürotropin aracılığı ile bağlanır. Distroglikan ekspresyon kaybı MDH'da saptanmıştır. MDH'da proteinüri oluştuğu distroglikan ekspresyonunda azalma izlenmekte olup distroglikan ekspresyonu ile hastalığın aktivitesi negatif korelasyon göstermektedir (60). Ayaksı çıkıntılara normale dönüştükçe distroglikan ekspresyonu da normalleşir. Bu fenomen MDH'a özgü olup FSGS'de distroglikan ekspresyonu değişmez.

Glomerül bazal membranından apoptoz, nekroz, adezyon kaybı gibi nedenlerle podosit ayrışması özellikle de hiperfiltrasyon nedenli FSGS patogeneğinde temel rol alır. Podositler proliferatif kapasiteye sahip olmadığından bazal membrandaki erozyone alanlar ile paryetal epitel etkileşimi başlar, sonuçta sineşi ve skar formasyonları gelişir.

Glomerüloskleroz mekanizmaları:

Renal hasarın tipi ne olursa olsun podosit sayısında azalmanın glomerüloskleroz gelişimine katkıda bulunduğu Kriz ve Rennke tarafından öne sürülmüştür. Podosit sayısında %10-20 oranında azalma glomerüloskleroza başlatır. Podosit sayısında azalmaya karşın mezangial ve

endotelial hücre sayısı normaldir. Glomerül bazal membranı çevreleyen sınırlı sayıda podosit bulunduğundan podositlerde azalma neticesinde bazal membranda çıplak, erozyone alanlar oluşur. Podosit hipertrofisi ile bu alanlar kompanze edilmeye çalışılsa da zamanla bu mekanizma da yetersiz kalır. Hidrostatik basınca bağlı kapiller yumakta oluşan dış doğru ekspansiyon bazal membranı Bowman kapsülüne doğru iterek sineşi oluşumuna neden olur.

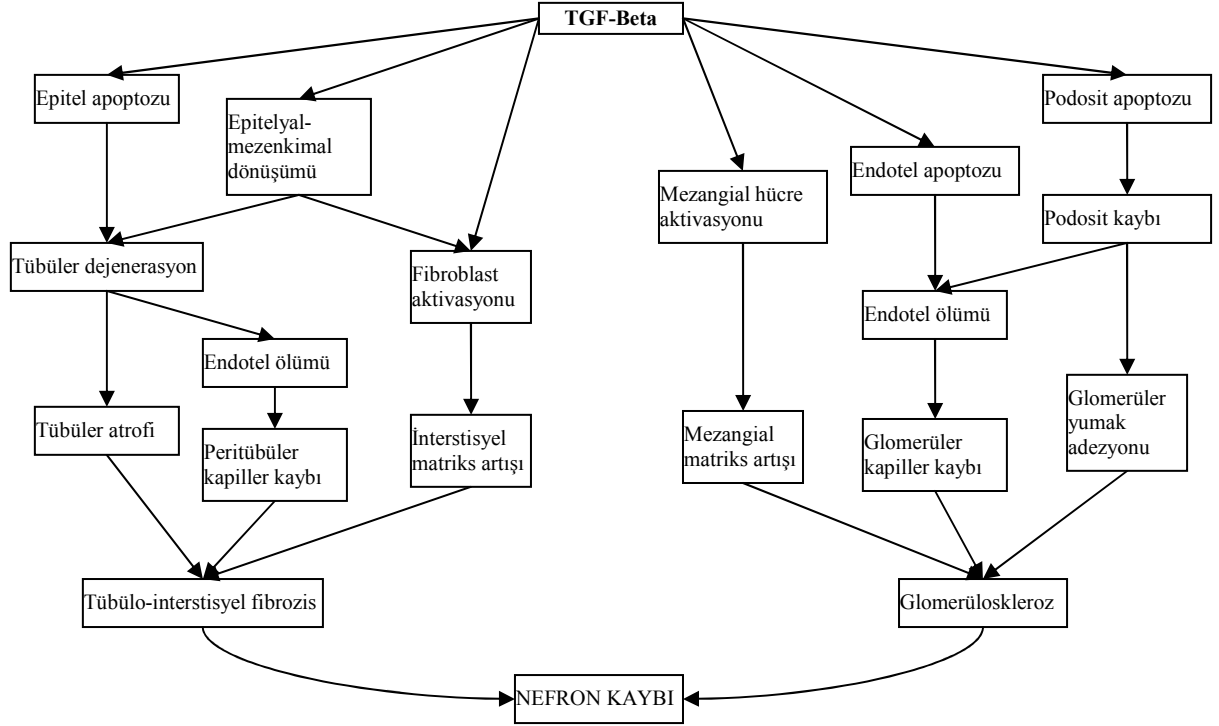
Kapiller yumakta hyalinozis ve progresif skarlaşma süreci başlar.

Podositopeni nedenleri:

1)Apoptozis: Apoptotik podositler büyük oranda idrar yoluyla atıldığından önceleri teknik olarak bu hücreleri göstermek zor olmuştur. Ancak son yıllarda V.D'Agati tarafından glomerüler hastalıklarda apoptozis gösterilmiştir. Bottinger ve arkadaşları TGF beta transgenik rat modellerinde artmış apoptozisi ve glomerüloskleroza göstermişlerdir. TGF betanın indüklediği apoptoziste Smad yolu aracılık etmektedir (38,75). Otokrin TGF beta 2/Smad 3/siklin bağımlı kinaz inhibitörü p15 sinyali podositlerde G0/G1 arresti ve podosit diferansiasyonunda etkili olmakla birlikte TGF beta ve Smad 7 G2/M arresti ve apoptoziste önemlidir. Proapoptotik P 38 mitojen aktive protein kinaz ve kaspaz 3 de TGF beta aracılığı apoptoziste rol alır. TGF betanın aracılık ettiği apoptozis ve epitelyal hücreden mezenkimal hücreye transdiferansiasyon mekanizmaları diferansiye podosit kaybında ve progresif renal yetmezlikte oldukça önemlidir. TGF ilişkili apoptozis, glomerüloskleroza, tübüler dejenerasyon ve atrofide, glomerüler ve peritübüler kapiller kaybında patogenetik role sahiptir. Siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri olan p21 ve p27 yokluğunda apoptozis hızlanmaktadır.

Singhal tarafından anjiotensin 2'nin de rat podositlerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Anjiotensinin indüklediği apoptozis kısmen TGF beta bağımlıdır.

Şekil III: TGF beta aracılı progresif nefron kaybı



2)Ayrışma: Podositlerin sayıca azalmasında bir diğer mekanizma bazal membrandan ayrışmadır. Ayrışan podositler apopitotik midir yoksa viabl hücreler olabilir mi sorusuna yanıt olarak idrardaki podositler incelemeye alınmıştır. Membranöz nefropati modeli olan Heymann nefriti ve diabetik nefropatinin ratlardaki streptozotocin modelinde idrardaki podositler nefrin, podosin gibi antikorlarla immunhistokimyasal olarak saptanmıştır. Bu hücrelerin doku kültüründe çoğalması nedeniyle bazal membrandan ayrılmış olan podositlerin bir kısmının viabl olduğunu kanıtlanmıştır.

3)Proliferatif cevap yokluğu: Glomerülogenezis boyunca immatür podositler hücre siklusuna girerek proliferere olurlar. Renal gelişimin S-fazında podositler siklustan çıkarak terminal diferansiye fenotiplerini kazanmaya başlarlar (23). Proliferasyon aşaması için

siklinler siklin bağımlı kinazlara (CDK) bağlanmak ve aktive etmek durumundadırlar (22,24,49). Ancak CDK'lar CDK inhibitörleri olan p21 , p27 ve p57 tarafından inaktive edilirler. İmmatür, proliferen olan podositlerde p27 ve p57 ekspresyonu yoktur. Ancak podosit diferansiasyonu p27 ve p57 inhibitörlerinde artışla birliktelik gösterir. Pasif Heyman nefritinde rat podositlerindeki Fx1A antijenine yönelik antikor verilerek podositlerin proliferasyon amaçlı siklin ve CDK miktarını artırma yeteneği incelenmiştir. C5b-9 yolu ile indüklenen zedelenme sonrasında siklin A ve CDK2'de artış olduğu saptanmış olsa da CDK inhibitörlerinin de arttığı ve proliferasyonu engellediği sonucuna varılmıştır.

4)Podosit mitoz anormalliği: Poliploidi DNA içeriğinde artış olarak tanımlanır ve histolojik olarak sıklıkla dev hücreler ile karakterlidir ve deneysel membranöz nefropatide podosit poliploidisi gösterilmiştir. Bu durum podositlerin mitozu girebileceğini ancak mitozu tamamlamada ya da hücre bölünmesinde engel olabileceğini düşündürmektedir. Hücre kültüründe C5b-9 podositleri hücre siklusuna yöneltse de G2/M fazında mitozu engelleyen faktörler söz konusudur. P53 ve P21'de artış mitozu engellemektedir. Ek olarak C5b-9'un in vivo ve in vitro olarak DNA zedelenmesine yol açtığı ve buna bağlı olarak mitozun engellendiği de ortaya konulmuştur (47).

5)Mekanik stres: Glomerüllerdeki zedelenme gören hücre tipinden bağımsız olarak progresif glomerüler skarlaşmada ortak yol intraglomerüler basınç artışıdır. Bu basınç glomerüler hücrelerde mekanik stres oluşturmaktadır. Mezanjial hücrelerde mekanik stres proliferasyona yol açarken podositlerde apoptozis ile sonuçlanmaktadır. Podositlerdeki mekanik stres CDK inhibitörlerinde artışa neden olurken proliferasyon bu mekanizma ile engellenmektedir (47).

Podosit transkripsiyon faktörleri: Wilms'tümör (WT)1 ekspresyonu fetal böbrekte metanefrik blastem, renal vezikül ve gelişmekte olan podositlerde izlenmekte olup erişkin dönemde ekspresyonu yalnızca podositlerde sınırlıdır (56,59). PAX2 geni erken gelişim aşamasında transkripsiyon faktörü kodlarken WT1 ekspresyonu matür glomerüllerde arttıkça PAX2 azalmaya başlar. WT1 ve PAX2 metanefrik gelişim aşamasında oldukça önemlidir. WT1 ekspresyonu konjenital ve edinilmiş hastalıklarda değişkenlik gösterebilir. Kollapsing glomerülopatide WT1 ekspresyonu hem kollaps olan hem de normal görünen glomerüllerde azalmış olup, podosit fenotipindeki regülasyon bozukluğunu göstermektedir. Nefrotik sendrom, erkek psödohermafrodizmi ve nefroblastom ile karakterli Denys Drash Sendromunda da WT1 ekspresyonunda anormallik mevcuttur. Bulgular podositlerin hücre siklusuna yeniden girişi ve podosit proliferasyonu ile ilişkilidir. LMX1B podosit diferansiasyonu ve fonksiyonu açısından önemli olan gen ekspresyonunun regülasyonunda rolü olan bir diğer transkripsiyon faktörüdür. Eksikliğinde ayaksı çıkıntılarda azalma, displazi, slit diyaframlarda eksiklikle karakterli gelişimsel bozukluk söz konusudur.

Podositopatilerin klasifikasyonu:

Podosit zedelenmesi minimal değişiklik hastalığı, fokal segmental glomerüloskleroz, kollapsing glomerülopati, membranöz nefropati ve diabetik nefropati gibi insanda ve deneysel glomerüler hastalıklarda izlenebilmektedir. Podosit zedelenmesi nefrotik sendromların patomekanizmasında temel rol oynar. Podosit biyolojisi ile ilgili son gelişmelerden sonra podosit hastalıkları için Mundel ve Barisoni tarafından yeni bir klasifikasyon önerilmiştir (8). Proteinürik hastalıkların oldukça farklı nedenleri olduğu gibi klinik seyirleri de farklılık gösterebilir. Yine benzer klinik prezantasyonda , spesifik klinik, laboratuvar parametrelerinin olmaması ve histolojik ayırt edilemeyen lezyonlar tanı ve tedavi güçlüğüne neden olmaktadır.

Podositopatiler arasında en sık rastlanan ve ayırıcı tanı güçlüğü olan antiteler FSGS ve MDH'dır .MDH'da progresif böbrek yetmezliği ya gelişmez ya da gelişme riski çok düşüktür. Ancak FSGS agresif tedavi ile kontrol edilemezse sıklıkla progresyon gösterir. Bu nedenle tedavi ve prognozları farklı olan bu antitelerin ayırıcı tanısı önem taşımaktadır. Histopatolojik parametreler ve elektron mikroskopik bulgular her hastada ayırıcı tanıya varmada yeterli olmayabilir. FSGS tanısı hastalığın yaygınlığına ve biyopsideki glomerül sayısına bağlıdır. MDH'da relapslarla seyreden olgularda takip biyopsileri fokal segmental glomerüloskleroz ile uyumlu gelebilir. Bu durum MDH'nın FSGS'a progresyonu şeklinde yorumlanmamalıdır. İlk biyopsi sklerotik glomerül içermiyor olabilir. Bu hastalıkların genetik ve patogenezinine yönelik bilgiler arttıkça bu iki farklı antiteyi ayırmak da daha kolay olacaktır. Podosit ilişkili protein ve gen ekspresyon analizi kalıtsal olan ve edinilmiş proteinürilerdeki ortak ya da farklı regülasyon yollarının aydınlatılması , tanısal ve prognostik yararlı bilgiler edinilmesi açısından değer taşımaktadır.

Tablo I: Podositopatilerin sınıflandırması

Histoloji	Patolojik varyant	Patojenik faktörler
Normal	Minimal değişiklik hastalığı Konjenital nefrotik sendrom	Distroglikan Nefrin
Diffüz mezangial skleroz	Denys-Drash sendromu Frasier sendromu	WT 1 WT1
Fokal segmental glomerüloskleroz	İdiyopatik Genetik Hiperfiltrasyon	Bilinmemekte Podosin, alfa aktinin4, beta1 integrin, CD2AP, LMX1B Mekanik stres
Kollapsing glomerulopati	İdiyopatik Viral	Bilinmemekte HIV1, Parvovirüs B19, SV40

MİNİMAL DEĞİŞİKLİK HASTALIĞI

İlk olarak Müler tarafından nefrozis terimi kullanıldıktan sonra Munk idrarda yağ cisimciklerinin ve otopsi çalışmalarında tübüllerde izlenen yağlı değişikliklerin saptanması üzerine lipoid nefrozis terminolojisini tanımlamıştır. İğne biyopsisi yaygın kullanılmadığından lipoid nefrozis terimi nefrotik sendrom ile seyreden farklı antiteleri de kapsamakta idi. Çocuklardaki lipoid nefrozis tanısı, klinik, histopatoloji ve tedaviye yanıtın kombinasyonuna dayanılarak verilmeye başlandığında bu terminolojinin tek bir antiteye spesifik olmaması üzerine minimal lezyon, minimal değişiklik nefropatisi gibi terimler kullanılsa da günümüzde çocuklarda daha sık görülen bu hastalığın farklı bir antite olması nedeni ile minimal değişiklik hastalığı terminolojisi tercih edilmektedir.

Klinik ve laboratuvar bulgular:

MDH erkek çocuklarda kızlara oranla yaklaşık iki kat daha sık görülmekte olup ortalama görülme yaşı 3'tür. 16 yaşından küçük çocuklarda insidansı 2-16/100.000'dir. Erişkinlerde özellikle Kafkas, İspanyol ve Asya ırklarında daha sıktır (10,71).

Klinik olarak ödem en sık semptomdur (25). Mikroskopik hematüri %13-36 oranında olup makroskopik hematüri çok nadirdir. Hiperkolesterolemi sıklıkla mevcuttur, %20 oranında hipertansiyon görülebilir. Serum kompleman düzeylerinde azalma genel olarak yoktur. Proteinüri selektif olup albumin permeabilitesi immünglobulin G gibi diğer makromoleküllere oranla daha fazladır. Bazı olgularda ödem olmaksızın yalnızca asemptomatik proteinüri olabilir, steroide iyi yanıt veren bu olgularda prognoz iyi olup relaps beklenmez. İzole proteinürisi olup ışık mikroskopik patoloji içermeyen , elektron mikroskopik incelemede

ayaksı çıkıntılarda silinme gözlenen olgular MDH'nın formudur ancak ayaksı çıkıntılarda silinmenin eşlik etmediği izole proteinüri MDH ile bağdaşmaz.

Erişkinlerde klinik bulgular çocuklardakine benzer olsa da hipertansiyon, nonselektif proteinüri ve akut renal yetmezlik tablosu daha siktir (30,50). Yine ilaç reaksiyonu veya lenfoproliferatif hastalık gibi sekonder MDH nedenleri erişkinlerde çocuklara oranla daha siktir. Fokal tübüler kayıp ve atrofi, arteriol ve arter duvarlarında kalınlaşma da erişkin forma eşlik edebilir.

Selektif proteinüri indeksi İgG'ye rölâtif albumin geçirgenliği olup 0.2'nin üzerinde olması nonselektif proteinüriyi işaret eder (17). Selektif proteinüri, filtrasyon bariyerinde yük defektini temsil ederken nonselektif proteinüri porların genişlemesi neticesinde çoğu makromolekülün permeabilite kazanmasını ifade eder . MDH 'da HLA DR7, İL 2, İL 4, İL8, İL13, İL18 seviyesinde artış da belirlenmiştir.

Minimal değışiklik hastalığında akut renal yetmezlik:

MDH olan erişkinlerde akut renal yetmezlik ileri yaş ve vasküler hastalıklarla ilişkilidir. Ancak çocuklarda vasküler hastalıklarla ilişkilendirmek güçtür. Artmış permeabilite tübül epitelini pek çok maddeye maruz bıraksa da MDH'da izlenen seçici permeabilite tübül epiteli için toksik maddelerin geçişine izin vermemektedir. Düşük plazma onkotik basıncı ve hipovoleminin rolü olabilir. Ayrıca endotelin 1 ekspresyonunun akut renal yetmezlikli hastalarda artmış olduğu saptanmış olup endotelin 1'in mezangial kontraksiyona neden olarak filtrasyon alanını ve filtrasyon oranını azalttığı öne sürülmektedir (13).

Işık mikroskopik bulgular:

Işık mikroskopik olarak glomerüler patoloji saptanmaz ya da minimaldir. Glomerüler kapillerler patent olup, kalınlaşma ya da düzensizlik izlenmez. Bazen mezangial matriks ve selülaritede hafif artış olabilse de fokal segmental glomerüler kollaps, skar, endokapiller proliferasyon ya da adezyon MDH tanısı ile bağdaşmaz. Podosit epitel hücre değişiklikleri ışık mikroskopik olarak saptanmaz. Eşlik eden yaygın interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi olmaksızın fokal hyalinize glomerül (fokal global glomerüloskleroz) görülebilir. Yaşla birlikte global sklerotik glomerül sayısı artış gösterir. Erişkinlerde izlenebilecek global skleroz gösteren glomerül sayısının üst sınırı hastanın yaşı/2-10 değerini aşmamalıdır (72). Tübüler sistemde ağır proteinüriye bağlı olarak rezorbe edilen proteinler hyalin dropletler şeklinde izlenebilir. Glomerüler iskemiye ya da yaşlanmaya sekonder fokal tübüler atrofi ve fibrozis sıklıkla erişkinlerde izlenebilir. Tekrar biyopsilerinde özellikle siklosporin tedavisine sekonder interstisyel fibrozis saptanabilir.

İmmunfloresan bulgular: Genellikle negatiftir. Ancak İmmunglobulin M ve kompleman (C3) mezangiumda elektron dense depozitlerle bağlantılı olmaksızın hafif yoğunlukta görülebilir ancak patolojik önemi yoktur.

Elektron mikroskopik bulgular: Elektron mikroskopik olarak görülen tek anomali ayaksı çıkıntılarda silinmedir. Elektron dense depozit görülmez. Ayaksı çıkıntılarda silinmenin derecesi ile proteinürinin şiddeti arasında bağlantı olup olmadığı konusunda araştırmacılar arasında farklı sonuçlar mevcuttur. MDH'da remisyon ayaksı çıkıntılarının normale dönmesi ile karakterlidir. Ayrıca slit diyaframda azalmaya bağlı slit porlarda bozulma, slit diyaframda apikale yer değiştirme, epitelyal hücrelerde vakuolizasyon, mikrovillus formasyonu, bazal membrandan fokal ayrışmalar da izlenebilir. Glomerüler bazal membran sıklıkla normal yapıda ve kalınlıktadır. Ancak %10 olguda incelmış görünümde olabilir.

İmmünohistokimyasal bulgular: İmmünohistokimyasal çalışmalarda genellikle podosit ilişkili alfa aktinin, podosin, podoplanin, podokaliksin ekspresyonunun kontrol grubuna oranla değişiklik göstermediği, sinaptopodin ekspresyonunun kantitatif görüntü analizi yöntemi ile değerlendirildiğinde MDH’da kontrol gruba oranla hafif derecede azaldığı saptanmıştır. Kim ve arkadaşları immunogold yöntemi ile nefrin düzeyini değerlendirmişler ve her filtrasyon poru için nefrin partikül sayısının değişmediğini buna karşın slit por sayısında azalma olduğunu göstermişlerdir. Lahdenkari ise nefrin genindeki nükleotid değişiklikleri sayısı ile hastalığın ciddiyeti arasında korelasyon olduğunu göstermişti (43). Bazal hücre membranında bulunan distroglikanın hem alfa hem de beta alt ünitelerinin de azaldığı gösterilmiştir.

Patogenez: Kesin olarak ortaya konmuş bir faktör ve patogenetik mekanizma yoktur. Ancak dolaşımda olasılıkla lenfosit kaynaklı ve glomerülün visseral epitel hücresi için toksik olan bir faktör üretilmektedir. Diğer taraftan atopi, besin alerjisi, hipersensitivite reaksiyonları ile birlikte giden nefropatiler anormal immün yanıtın etkili olabileceği hipotezini desteklemektedir. Bu iki teori kombine edilirse normal immünitelerdeki bazı bozukluklar sonucunda dolaşımdaki faktörün üretimine neden olarak permeabilite artışına yol açabilir. MDH’da glomerüler yük kaybı oldukça önemlidir. MDH olan hastaların T lenfositlerinde vasküler permeabilite faktörü saptanmıştır. Yine plazma ve idrarda soluble immune response supressor (SIRS) ve hemopeksin gibi katyonik maddeler izole edilmiştir. Bu maddeler GBM’da yük değişikliğine neden olmaktadır. Holt tarafından MDH olan çocuklarda plazma heparanaz düzeyinde azalma saptanmış olup, bazal membranda heparan sülfat kaybına bağlı negatif yük kaybı olduğu belirtilmiştir (26). MDH’da hümmoral immüniteden çok hüccresel immünite üzerinde durulmuştur. T lenfositlerin bilinmeyen bir antijene karşı epizodik olarak aktive olmakta ve lenfokin üretimi ile permeabilite etkilenmektedir. Ayrıca T lenfositler

tarafından üretilen interlökinler de bazal membran ve epitelde zedelenmeye yol açarak proteinüriye neden olmaktadır.

Prognoz ve klinikopatolojik korelasyon:

Çocuklarda steroid tedavisinde yaklaşık sekiz hafta sonra %90-95 oranında remisyon izlenirken erişkinlerde sekiz haftalık ek tedavi sonrası remisyon oranları %80'lerdedir. Çocuklarda 4 yıllık izlem relaps oranı %5,5 oranında iken erişkinlerde %21 oranında saptanmıştır. Çocuk hastalarda tekrarlayan relapslarda ilk prezantasyonun 6 yaş altı olması risk faktörüdür. Nükleer faktör kapa B subünitleri p65/p60 olup steroid dirençli olgularda p50/p50 homodimeri bulunur. P65 yokluğu glikokortikoidlerin immunsupresör etkisini bozduğu için bu vakalarda siklofoskamid ve siklosporin gibi immunsupresifler kullanılmaktadır. MDH'da kronik renal yetmezliğe progresyon %1'den azdır. Başlangıç steroid tedavisine yanıt vermeyen olguların biyopsilerine bakıldığında tübüler değişiklikler %14 oranında, diffüz mezangial hiperselülarite %45 oranında ,fokal glomerüler skleroz %7,8 oranında, hafif mezangial matriks artışı 56.3 oranında saptanmış olup %4.7 oranında ışık mikroskopik patolojinin eşlik etmediği görülmüştür. Bernstein ve Edeelman diffüz mezangial hiperselülaritenin ciddi zedelenmeyi yansıttığını ve ek tedaviye gereksinim olduğunu öne sürmüştür(9). Ayrıca mezangial hiperselülaritenin sık relapslarla ilişkili olduğu da gösterilmiştir (70). Önceleri mezangial hiperselülaritenin uzun dönem prognoza etkisinin olmadığı savunulurken son dönemde mezangial hiperselülarite ve immatür glomerül varlığının remisyonu kısalttığına ilişkin çalışmalar mevcuttur (53). Fokal global glomerüloskleroz glomerüllerin %15'inden fazlasında mevcut olan ve tübüler atrofi ile interstisyel fibrozisin eşlik ettiği global skleroz olarak tanımlanmıştır ancak tedaviye yanıt ya da uzun dönem prognoza etkisi tam olarak bilinmemektedir.

FOKAL SEGMENTAL GLOMERULOSKLEROZ

1957 yılında Arnold Rich nefrotik sendrom nedeni ile ölen çocukların otopsilerinde jukstamedüller glomerüllerde segmental skleroz alanları saptanmış ve glomerulosklerozun idiyopatik nefrotik sendromda progresif renal yetmezliğin göstergesi olduğunu savunmuştur. Ancak 1970'lerde "International Study of Kidney Diseases in Children" tarafından FSGS'un farklı bir klinikopatolojik antite olduğu, steroidlere direnç ve progresif renal yetmezlik açısından MDH'dan ayrılması gerektiği vurgulanmıştır. 1970-80'li yıllarda erişkinlerde en sık nefrotik sendrom nedeni membranöz nefropati iken son iki dekada FSGS insidansı belirgin artış göstermiştir (18,34). Nefrotik sendromu olan Afrika kökenli Amerikalı'larda FSGS %56-78 sıklıkla görülmekte olup dünyadaki en yüksek orana sahiptir. Prevelanstaki artış çevresel nedenlere ve FSGS'un morfolojik tanımının genişlemesine bağlıdır.

FSGS genel olarak nefrotik düzeyde proteinüri, glomerüllerin bazılarında (fokal) ve glomerüler yumağın bir kısmında (segmental) skleroz ve ayaksı çıkıntılarda silinme ile karakterli klinikopatolojik bir sendromdur . FSGS tanısı morfolojik bulguların nonspesifik olması ve diğer glomerüler süreçlerin üstüne de eklenebilmesi nedeniyle zordur. Primer (idiyopatik) FSGS podosit ilişkili proteinleri ilgilendiren genetik mutasyon, viral neden ya da ilaç toksisitesi gibi etiyolojik nedenlerin belirlenebildiği sekonder FSGS formlarından ayırt edilmelidir. Primer ve sekonder FSGS formları da inflamatuvar, trombotik, proliferatif, herediter (kronik glomerülonefrit, Alport, mitokondriyel sitopati vb.) nedenli nonspesifik fokal segmental glomerüler skardan ayırt edilmelidir. Glomerüler skleroz kapiller kollapsla karakterli olup glomerüler arktitektür seçilebilirken, skar formasyonunda bazal membran tip 4 kollajenin yerini skar kollajeni tip 3 ve 4 almakta ve glomerüler yapı bozulmaktadır. Ancak morfolojik ayırım neredeyse imkansızdır. Glomerüler kapiller ya da sklerotik alanlarda

eosinofilik aselüler materyal olan hiyalin, spesifik olmamakla birlikte FSGS'a eşlik edebilir.

Hastalık progresyon gösterdikçe daha diffüz ve global patern izlenebilir.

Tablo II: Fokal segmental glomerüloskleroz sınıflandırması

Podosit zedelenmesi, bilinmeyen nedenle

Primer FSGS

Podosit zedelenmesi, nedeni bilinen

Viral

HIVAN

Parvovirüs B19

ilaçlar

Interferon- α

Pamidronate

Lityum

Yapısal ve/veya fonksiyonel adaptasyona sekonder

Fonksiyonel nefronlarda azalma ile

Unilateral renal agenezi

Oligomeganefti ve segmental hipoplazi

Renal displazi

Erişkin tipi polikistik böbrek

Reflü nefropati

Kronik interstisyel nefrit ve pyelonefrit

Parsiyel kortikal nekroz

Papiller nekroz (analjezik nefropati)

Orak hücreli anemi

Primer glomerülopatiler

Nefrektomi ya da geniş cerrahi

Kolesterol ateroembolizasyon

Hipertansiyon

Başlangıçta normal sayıda nefronlar ile

Morbid obezite

Siyanotik konjenital kalp hastalığı

Diabetik nefropati

Glikojen depo hastalığı

Familiyal disotonomi

Akromegali

Genetik hastalıklara sekonder

Fokal proliferatif glomerulonefritlere sekonder

Diğer nedenler

Clq nefropati

Renal tübüler asidoz

Sarkoidoz

Kaposi sarkomu

Artmış kas kitlesi

Behçet hastalığı

Prader-Willi sendromu

Guillain-Barre sendromu

Turner Sendromu

Non-Hodgkin lenfoma

Sistemik lupus eritematozus

Loa loa filaryazis

Şistozomiazis mansoni

Preeklamsi

Renal transplantasyon

Glikojen depo hastalığı tip 1

Familiyal disotonomi

Eroin

Klinik ve laboratuvar bulgular: FSGS MDH'a oranla daha ileri yaşta görülmektedir, hematüri , hipertansiyon, renal yetmezlik insidansı daha yüksektir ve sıklıkla steroidde yanıt vermeyen nonselektif proteinüri mevcuttur (34). Renal yetmezlik bulguları hastalığın başlangıcında mevcut olabilir ve serum üre nitrojen seviyesinde artış, glomerüler filtrasyon oranında azalma ile birlikte dir. serum kompleman düzeyleri sıklıkla normaldir.

Histopatoloji: Skleroz, selülarite, hyalin depozitlerle karakterli segmental lezyonlar sıklıkla glomerülün periferinde olup Bowman kapsülü ve glomerüler yumak arasında adezyonlar da görülebilir. Tek bir kesitte lezyonun fokal natürünün saptanması için glomerüllerin %10-30 oranında etkilenmiş olması gerekir. Etkilenmemiş glomerül sayısı hastalığın evresi ile ilişkilidir . Jukstaglomerüler glomerüllerdeki artmış kapiller basınca bağlı olarak sklerotik lezyonlar sıklıkla bu bölgede zonal dağılım gösterir .Biyopsinin bu bölgeden alınması önem taşımakta olup ilk biyopsisi normal olup steroidde yanıt vermeyen olguların tekrar biyopsilerinde segmental skleroz saptanabilir. Segmental lezyonların intraglomerüler orijini hiler ya da tübüler (proksimal tübülün bowman kapsülünü terk ettiği yer) olabildiği gibi kuşkulu da olabilir. Karışık lokalizasyon oldukça sık olup saf form %15'den azdır. Segmental lezyonda hiperselülarite intrensek glomerüler hücre proliferasyonu ya da lökositik hücre infiltrasyonu şeklindedir. Visseral epitel proliferasyonu özellikle selüler-kollapsing tipte gözlenen bir bulgudur. Ancak matür podosit fenotipi mevcut olmayıp GLEPP-1, WT1, C3b, sinaptopodin, podokaliksin gibi podosit belirleyicilerini eksprese etmezler. Bu belirleyicilerin ekspresyon kaybı podosit zedelenmesini yansıtabilir. Prolifere hücreler matür podositlerde izlenmeyen sitokeratin ve makrofaj belirleyicisi olan CD68 ekspresyonu gösterebilirler. Bu durum paryetal epitel hücreleri ve makrofajların da proliferasyonda payı olduğunu göstermektedir. Prolifere hücreler sklerotik segment üzerinde tek sıra kaldırım taşı şeklinde ya da koheziv dizilirler. Hücreler hipertrofik, geniş veziküle nükleuslu, belirgin nükleollü,

bazofilik sitoplazmalı, vakuollüdür. Mitoz ve dev hücreler görülebilir. Bazal membrandan fokal ayrışmalar neticesinde büyük psödokistler izlenebilir.

Lökositler ,köpüksü hücreler, hücrel debrisler sklerotik segmentte toplanabilir. Köpüksü hücreler FSGS'de %45-78 oranında görülür ve lizozim ile pozitif boyanan monosit profili gösterir. Schonholzer köpüksü hücreler içeren glomerül yüzdesinin FSGS'de MDH ve membranöz nefropatiye oranla daha fazla olduğunu saptamıştır (65).

Mezangial hiperselülarite mezangial alanda 3'ten fazla hücreyi ifade eder ve FSGS'da mevcut ise diffüzdür. Çocuklarda erişkinlere oranla daha sık rastlanır, prognostik önemi bilinmemektedir. FSGS progresyonu ile birlikte glomerüler yumakta solidifikasyon ve global skleroz başlar. Ancak global skleroz özellikle de fokal ise FSGS için diagnostik değildir. İnterstisyel fibrozis ile birlikte olan kronik tübüler atrofi normal glomerül yapısı mevcut olsa da şüphe uyandırmalıdır. Arterioller hyalinozis yine sıkça gözlenen bir bulgudur ve ağır epitelyal zedelenme, yüksek kreatin seviyesi ve yüksek miktarda albümin atılımı ile birlikte.

İmmunfloresan bulgular:Granüler ya da lineer bir patern olmaksızın segmental skleroz odaklarında immunglobulin M ile birlikte kompleman (C3) depolanması görülebilir. C1q, C4, İgG ve İgA depolanması da daha nadir olarak izlenebilir. Etkilenmemiş olan glomerüllerde mezangiumda lineer, paramezangial ya da granüler zayıf İgM ve beraberinde C3 depolanması görülebilir.

Elektron mikroskopik bulgular: Podosit ayakları çıkıntılarda silinme majör ultrastrüktürel bulgu olup, primer FSGS'de yaygın olup, sekonder formlarda daha çok yama tarzındadır. Ek olarak epitelyal vakuolizasyon, mikrovillus formasyonu, slit porlarda genişleme , ayakları

çıkıntılarda bazal membrandan ayrışma, bazal membranda yer yer incelme, lamina densada irregüler görünüm izlenebilir. Mezangial hücrelerde golgi ve plazmik süreçlerde nekroz sklerotik alanlarda hiposelüler görünüme neden olur.

İmmunhistokimya ve moleküler patoloji:FSGS ve MDH'nın ayırıcı tanısına yönelik tanısal ekspresyon profilini ortaya koyabilmek amacıyla renal biyopsilerde immünhistokimyasal ve moleküler tekniklere önem verilmeye başlanmıştır. Koop ve ark. tarafından nefrin, podosin, CD2AP, podokaliksin, Schmid ve ark. tarafından alfa aktinin 4, sinaptopodin, distroglikan, nefrin ve podoplanin protein ekspresyonu ve mRNA seviyeleri çalışılmış her iki çalışmada da podosit zedelenmesi ve podosit ilişkili gen ekspresyonu arasında bağlantı saptanmıştır (64). Genel olarak protein ekspresyonunda azalma saptanmakla birlikte mRNA seviyesinde çok önemli bir artış olmadığından gen ekspresyon analizinin tanısal açıdan çok da yararlı olmadığı sonucuna varılmaktadır. Schmid glomerüllerdeki değişken oranlardaki "housekeeper" cDNA'nın bu yapının subpopülasyonu olan hücrelerdeki ekspresyon oranında karışıklığa neden olduğunu belirtmiştir. Podosit spesifik cDNA'yı referans gen olarak edinilen podosin ve sinaptopodin ekspresyon oranlarını karşılaştırdığında FSGS ve MDH vakaları arasında oldukça anlamlı fark saptamıştır.

Moleküler yöntemler patolojik podosit fenotipini aydınlatmak ve glomerüler mikrodiseksiyon, lazer mikrodiseksiyon, RT-PCR gibi teknikleri açısından oldukça ilgi çekicidir.

Bu çalışmalar FSGS ve MDH ayırımında terapötik yaklaşım ve biyopsi kombinasyonuna çok da üstünlük sağlamamaktadır.

Patogenezi:

Genetik: NPHS1 (nefrin), NPHS2 (podosin) ve ACTN4(alfa aktinin 4) mutasyonları önemlidir. Slit diyaframda lokalize diğer proteinlerdeki mutasyonlar ise deneysel hayvan modellerinde gözlenmiş ancak insanlarda henüz saptanmamıştır.

Humoral faktörler: İmmünglobulinler, immünglobulin olmayan lenfosit ürünü sitokinler ve tekrarlayan FSGS olgularında önemi olan dolaşımsal faktördür. Glomerüler skarlar da nonspesifik İgM ve kompleman birikimi hipertansiyon, diyabet ve sekonder FSGS ‘de de görülebildiğinden ve hayvan modellerinde anti podosit antikorlara yanıt segmental skar olabilse de insanlarda antijenik hedefler tanımlanmadığından immünglobulinlerin primer FSGS’ye etkisi net değildir.

Fibrojenik TGF-beta/Smad sinyal yolunun aktivasyonu, fibrojenik PDGFR –beta artmış regülasyonu ve hücresel immünite fibröz skar oluşumunda etkili olsa da sitokinlerin glomerüler zedelenmeye direk etkisi bilinmemektedir.

Deneysel hayvan modellerinde rekürren FSGS’li hastaların serumlarının enjeksiyonu sonrası proteinüri saptanmıştır (84). Yine kollapsing glomerülopatili hastaların serumlarının enjeksiyonu, glomerüler kollaps, podositlerde şişme ve hipertrofi ile sonuçlanmıştır (4). Nefrotik sendromlu hastaların plazmalarının insan podosit hücre kültüründe slit diyafram proteinlerinde diffüz sitoplazmik yeniden dağılıma neden olduğu gösterilmiştir (14). Plazmada bulunan permeabilite faktörü lenfokinlerden büyük, anyonik hidrofobik bir madde olup protein A’ya bağlanır, ancak immünglobulin olup olmadığı net değildir (48,62). Hastaların plazmaferezden değişen oranlarda fayda görmesi permeabilite faktörünün podosit zedelenmesi ile proteinüri oluşturduğunu ancak segmental patoloji ve skar formasyonunda diğer patojenik faktörlerin de varlığını göstermektedir (1).

Hemodinamik zedelenme ve glomerüler hipertrofi: Renal kütlerde azalma kompensatuar hiperfiltrasyona ve transkapiller basınç artışına neden olur. Bu glomerüler hipertansiyon FSGS patogeneğinde önem taşır. Fogo, MDH olan ancak glomerülleri hipertrofik olan hastaların tekrar biyopsilerinde FSGS'a rastlanma oranının yüksek olduğunu belirtmiştir. Hipertansiyon ya da vasküler dilatasyon kompensatuar hipertrofide ve glomerüler sklerozda etkilidir.

Podosit zedelenmesi: Kollapsing glomerülopati, rekürren FSGS, HIV ilişkili nefropati gibi durumlarda podosit fenotip kaybı mevcut olup bu durum podosit transdiferansiyasyonu, regülasyon bozukluğu ya da mezankimal epitelyal diferansiyasyon olarak nitelendirilmektedir. Matürasyon sonrası proliferasyona dirençli olan podositler kollapsing, HIV ilişkili FSGS gibi durumlarda hücre siklusuna yeniden girmekte olup proliferasyon siklin grubu proteinlerin fosforilasyonu yolu ile başlamaktadır. CDK inhibitörleri de kollapsing-selüler formda azaldığından proliferasyon kolaylaşmaktadır.

Fokal segmental glomerulosklerozun patolojik klasifikasyonu: Primer ve sekonder FSGS morfolojik olarak heterojen olup patolojik spektrumu oldukça komplekstir. Bu nedenle 2000 yılında uluslararası renal patologlar grubunca FSGS için morfolojik klasifikasyon yapılmıştır (16). FSGS (NOS), perihiler, tip, selüler ve kollapsing olmak üzere 5 varyant tanımlanmıştır. Günümüzde bu morfolojik varyantların patogenetik farklılıkları mı yoksa podosit zedelenmesinin farklı evrelerini ve farklı derecelerini mi yansıttığı bilinmemektedir. Bu klasifikasyonun amacı da klinikopatolojik çalışmalar eşliğinde ileride bu soruların yanıtını bulmaktır.

Tablo III: FSGS'un morfolojik sınıflaması

Varyant	Tanı kriterleri	Dışlama kriteri
FSGS (NOS)	En az bir glomerülde kapiller lümeninde daralmaya yol açan segmental matriks artışı Podosit hiperplazisi olmaksızın glomerüler kapiller kollapsı olabilir	Perihiler, sellüler, tip ve kollapsing varyantlar dışlanmalıdır.
Perihiler varyant	En az bir glomerülde sklerozla birlikte veya sklerozsuz perihiler hyalinozis Segmental lezyonu olan glomerüllerin %50'sinden fazlasında perihiler skleroz ve/veya hyalinozis olmalıdır	Sellüler, tip ve kollapsing varyantlar dışlanmalıdır.
Sellüler varyant	En az bir glomerülde lümeni tıkayan segmental endokapiller hipersellülarite, köpüksü hücreler ve karyoreksis bulunabilir.	Tip varyant ve kollapsing varyant dışlanmalıdır.
Tip varyant	Tip bölgesini tutan en az bir segmental lezyon (glomerüler yumağın proksimal tübül orijini tarafındaki dış %25'i) Tübüler kutup tanımlanan lezyonda seçilebilmelidir Lezyon adezyon veya tübül lümeninde podositler ile paryetal ve tübüler hücre kümeleri içermeli Tip lezyonu sellüler veya sklerozan olabilir	Kollapsing varyant dışlanmalıdır Herhangi bir perihiler skleroz dışlanmalıdır
Kollapsing varyant	En az bir glomerülde segmental veya global kollaps ve üzerinde podosit hipertrofi ve hiperplazisi	Yok

PROGNOZ

Nefrotik düzeyde proteinüri ve nefrotik sendrom, yüksek serum kreatinin düzeyleri, interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi, kollapsing lezyon, streoide yanıt vermeyen proteinüri varlığı FSGS'da kötü prognostik faktörlerdir. Nefrotik sendrom ve FSGS 10 yıllık yaşam süresi %30'larda iken FSGS ve asemptomatik proteinüri varlığında bu oran %90'lardadır. Son dönem böbrek hastalığında serum kreatinin seviyesinin 1.3'ün üzerinde olmasının oldukça önemli bir belirleyici olduğu gösterilmiştir. Siyak ırkta beyazlara oranla daha kötü prognoza sahiptir. Çocuklarda steroid tedavisi ile %60 oranında remisyon saptanırken erişkinlerde bu oran %50'dir. Steroid tedavisine başlangıçta verilen yanıt da önemli bir prognostik belirleyicidir. Histopatolojik olarak glomerüldeki segmental lezyonun yeri, glomerüler köpüksü hücrelerin varlığı, hiyalinozis, mezangial hiperselülarite, segmental ve global skleroz oranı gibi bulguların prognozu etkilediği Schwartz ve Korbet tarafından ortaya koyulmuştur (67). Ancak başlangıçta var olan kreatinin yüksekliği ve interstisyel fibrozisin son dönem böbrek hastalığını belirlemede önemli olduğu gösterilmiştir. Yine FSGS morfolojik varyantlarından kollapsing form büyük oranda progresyon göstermekte ya da 15 ay-5 yıl içinde ölümle sonuçlanmaktadır. Selüler form da kollapsing forma oranla daha az olmakla birlikte FSGS (NOS)'dan daha yüksek oranda progresyon göstermektedir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

2002-2007 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji anabilim dalında fokal segmental glomerüloskleroz tanısı almış 37 olgunun , mezangial proliferasyon ile karakterli böbrek biyopsisi olan 25 olgu ve minimal değişiklik hastalığı tanısı alan 12 olgunun materyalleri incelendi. Tanıları, yaşı, cinsiyeti ve klinik verileri olan toplam 37 hastanın bulguları kaydedildi. Sonuçları karşılaştırmak amacı ile renal hücreli karsinom nedeni ile nefrektomi olan 10 hastanın normal görünümdeki böbrek dokuları kontrol grubu olarak çalışmaya alındı.

İmmunhistokimyasal yöntem:

Hastalara ait parafin bloklardan podosit ilişkili proteinler olan nefrin, podosin, sinaptopodin, transkripsiyon faktörü olan WT 1 ve proinflamatuvar belirleyicilerden TGF beta 1 ile CD 68 ekspresyonunu belirlemek amacıyla immünhistokimyasal boyama için kesitler hazırlandı.

İmmünhistokimyasal boyama streptavidin-biyotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak yapıldı. İncelemede Nefrin (insan NPHS1 proteini karboksi terminal kısmına yakın 14 aminoasitlik peptid epitoplulara poliklonal tavşan antikor, Lifescan Bioscience), podosin (insan NPHS 2 proteini 367-383 aminoasitlerine karşılık gelen sentetik peptide yönelik tavşan poliklonal antikor, ABCAM), sinaptopodin (insan sinaptopodin 2'deki 566-585 arası aminoasitlere uyan sentetik peptide yönelik tavşan poliklonal antikor, ABCAM), WT 1 (insan WT 1 proteini C terminaline uyan sentetik peptide yönelik poliklonal tavşan antikor, ABCAM) , TGF beta 1 (insanda plateletlerdeki TGF beta 1'e karşı üretilen monoklonal fare antikor, ABCAM) ve CD 68 (insan alveoler makrofajlarındaki fraksiyona yönelik IgG 1 türünde fare monoklonal antikor, Santa Cruz) kullanıldı. Antikorlar kullanılmadan önce PBS ile aşağıda belirtilen oranlarda dilüe edildi.

NPHS1(nefrin)ve NPHS 2(podosin): 1/500

Sinaptopodin:1/250

WT 1:1/100

TGF beta 1:1/500

CD 68:1/100

Kullanılan biyotinlenmiş bağlayıcı (sekonder) antikor, streptavidin-biyotin kompleksi ve DAB ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklindeydi.

- 1- 3-4 mikron kalınlığında kesitler 56 C'lik etüvde 12 saat tutularak deparafinize edildi.
- 2- Yarım saat ksilolde bekletildi.
- 3- Beşer dakikalık sürelerle sırasıyla %100, %95 ve %90'lık alkolden geçirilerek hidrasyonları yapıldı.
- 4- Çeşme suyu ile yıkandı.
- 5- Endojen peroksidazı bloke etmek için %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildi.
- 6- PBS buffer (pH 7,6) ile 5 dakika süresince yıkandı.
- 7- 0.01M sodyum sitrat tamponu (pH 6) içinde toplam 20 dakika süre ile mikrodalga fırında işleminden geçirildi.
- 8- Distile su ile 3 kez yıkandı.
- 9- Kesitler 20 dakika süre ile non-immun protein bloklama serumunda bekletildi.
- 10- Birincil (primer) antikorlar NPHS 1, NPHS 2, sinaptopodin, WT 1, TGF beta 1 ve CD 68 kesitleri kapatacak şekilde uygulandı. Antikorlar oda sıcaklığında 2 saat süre ile bekletildi.
- 11- İki kez beşer dakika PBS ile yıkandı ve kurulandı.
- 12- Bağlayıcı (sekonder) antikor (Multi-species ultra streptavidin detection system-HRP, Zymed, Massachusetts, USA) ile oda sıcaklığında 20 dakika süre ile inkübasyon yapıldı.

13- İki kez beşer dakika PBS ile yıkandı.

14- Streptavidin-biyotin kompleksi uygulanarak 30 dakika bekletildi. (Zymed)

15- İki kez beşer dakika PBS ile yıkandı.

16- 3 dakika süre ile renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla DAB (diaminobenzidintetraklorid; Zymed, USA) ile inkübasyon yapıldı.

17- Beş dakika distile su ile yıkandı.

18- Zemin çabuk boyama yöntemi ile Mayers hematoksilin ile boyandı.

19- Dehidrasyon için kesitler sırasıyla %90, %95 ve %100'lük alkolde beşer dakika tutuldu, ksilolde şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

Pozitif doku kontrolleri olarak nefrin, podosin, sinaptopodin ve WT-1 için normal böbrek dokusu, CD 68 ve TGF beta 1 için tonsil dokusu kullanıldı.

BOYANMANIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nefrin, sinaptopodin ve podosin antikorları için boyanma paterni, boyanma şiddeti ve ekspresyon kaybı değerlendirildi. Boyanma paterni, glomerüler bazal membranlar boyunca lineer, ince granüler ya da kaba granüler olmak üzere üç grupta incelendi. Biyopside iki patern mevcudiyetinde baskın olan boyanma paterni ele alındı. Boyanma şiddeti kontrol grubu ile karşılaştırılmak kaydı ile subjektif olarak zayıftan şiddetliye doğru üç kategoride incelendi. Zayıf boyanma=(+), orta şiddette boyanma =(++), yoğun boyanma =(+++), olarak değerlendirildi.

Glomerüllerde ekspresyon kaybı değerlendirilirken biyopsi örneklerinde hem ekspresyon kaybı olan glomerüllerin yüzdesi, hem de en fazla ekspresyon kaybının gözlemlendiği glomerüldeki alan yüzdesi hesaplanarak veriler kaydedildi.

TGF beta 1 ve CD 68 ekspresyonu ise biyopsi örneklerinde bu antikorları eksprese eden glomerül yüzdeleri ve glomerüllerdeki sitoplazmik olarak pozitif boyanan ortalama hücre yüzdeleri hesaplanarak değerlendirildi.

WT 1 ekspresyonu açısından glomerüllerde nükleer olarak pozitif boyanan podositlerin yüzdeleri hesaplanarak kaydedildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Toplam 84 olgunun ekspresyon paternleri, ekspresyon oranları ve boyanma şiddetleri ile klinikopatolojik veriler değerlendirildi. Elde edilen veriler SPSS 13.0 programında bilgisayara kaydedildi. Çapraz tablolarda χ^2 testi, non-parametrik verilerde dörtlü karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İkili karşılaştırmalarda ise Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı ve $p<0,05/4=0,0125$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Antikorların ekspresyon oranları ve laboratuvar verilerinden oluşan sayısal değişkenlerin korelasyonunda Pearson bağıntı katsayısı, boyanma paterni ve laboratuvar verilerini kapsayan ordinal ve sayısal değişkenlerin korelasyonunda ise Spearman bağıntısı kullanıldı.

BULGULAR

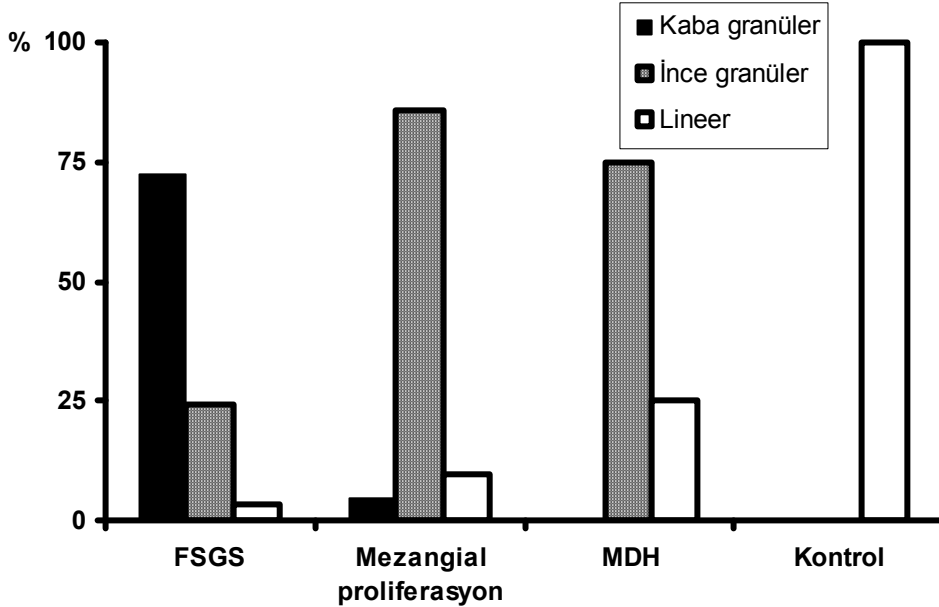
Çalışmaya dahil edilen 84 olgunun %54,8'i (N=46) erkek, %45,2'si (N=38) kadındı. Ortalama yaş 29(+/-18,168) idi (dağılım aralığı1-66). 15 yaş altı çocuk hastalar olguların %29,8'i (N=25) olup 15 yaş üstü olgular %70,2 'si (N=59) idi. Tanı grupları arasında 15 yaş altı ve üstü olgular açısından anlamlı fark mevcut değildi (p=0,354). Genel olarak klinik, histolojik ve immunfloresan bulgular eşliğinde tanı konulan hastaların 28'inin elektron mikroskopik incelemesi mevcut olup ayaksı çıkıntılarda silinme ile karakterli idi. FSGS olgularının 24'ü NOS, 11'i perihiler, 1'i tip ve 1'i selüler varyantla karakterli idi.

Tablo IV: Vakaların tanılarına göre dağılımı

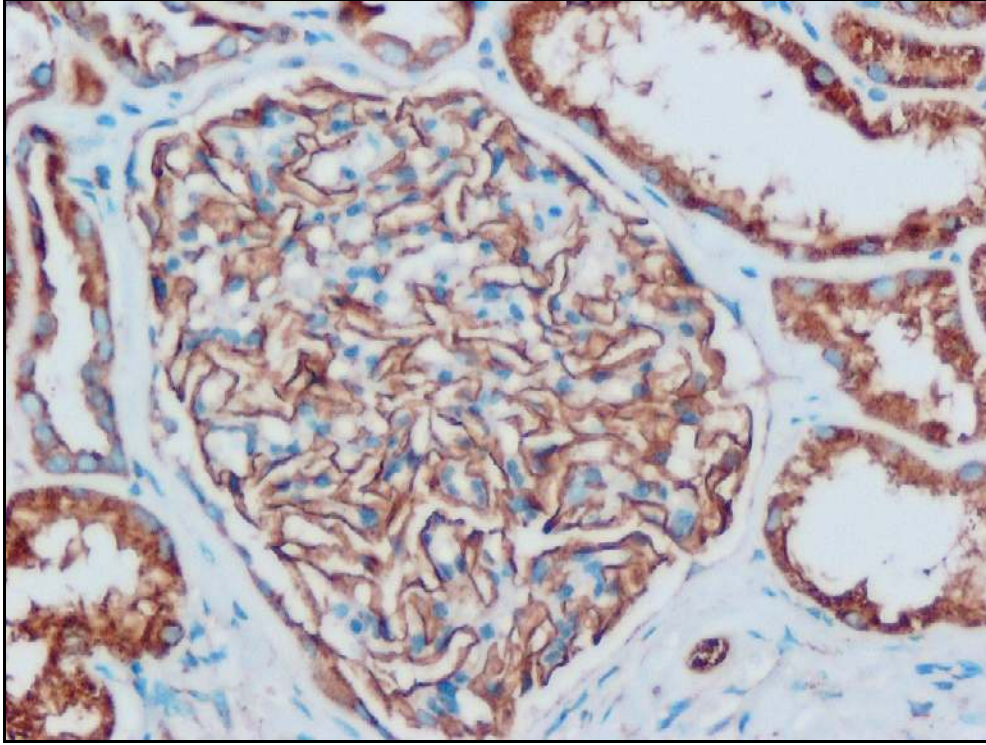
Tanı	Sayı	Yüzde
Fokal segmental glomerüloskleroz	37	44,0
Diffüz mezangial proliferasyon	25	29,8
Minimal değişiklik hastalığı	12	14,3
Kontrol	10	11,9
Toplam	84	100

Nefrin boyanma paterni değerlendirildiğinde normal görünümdeki kontrol olgularının tamamında glomerüler bazal membran boyunca lineer boyanma paterni izlenirken , fokal segmental glomerüloskleroz olgularında %72,4 oranında kaba granüler, bazal membranlar boyunca parçalanmış ya da dağılmış izlenimi veren boyanma paterni dikkati çekti. FSGS olgularında %24,1 oranında ince granüler, %3,4 oranında lineer, ancak kesintili boyanma paterni saptandı.. Minimal değişiklik hastalığında %75 oranında ince granüler, %25 oranında lineer boyanma paterni izlendi. Mezangial proliferasyonla karakterli biyopsilerde ise %52,9 oranında ince granüler, %33,3 oranında lineer , %4,8 oranında ise kaba granüler boyanma paterni görüldü. FSGS ve kontrol olgularında sıklıkla visseral glomerüler epitel hücre(VGEH) sitoplazmalarında boyanma izlenmezken , MDH’da VGEH sitoplazmalarında da ince granüler boyanma mevcuttu. Segmental ve global skleroz odaklarında boyanma izlenmedi.

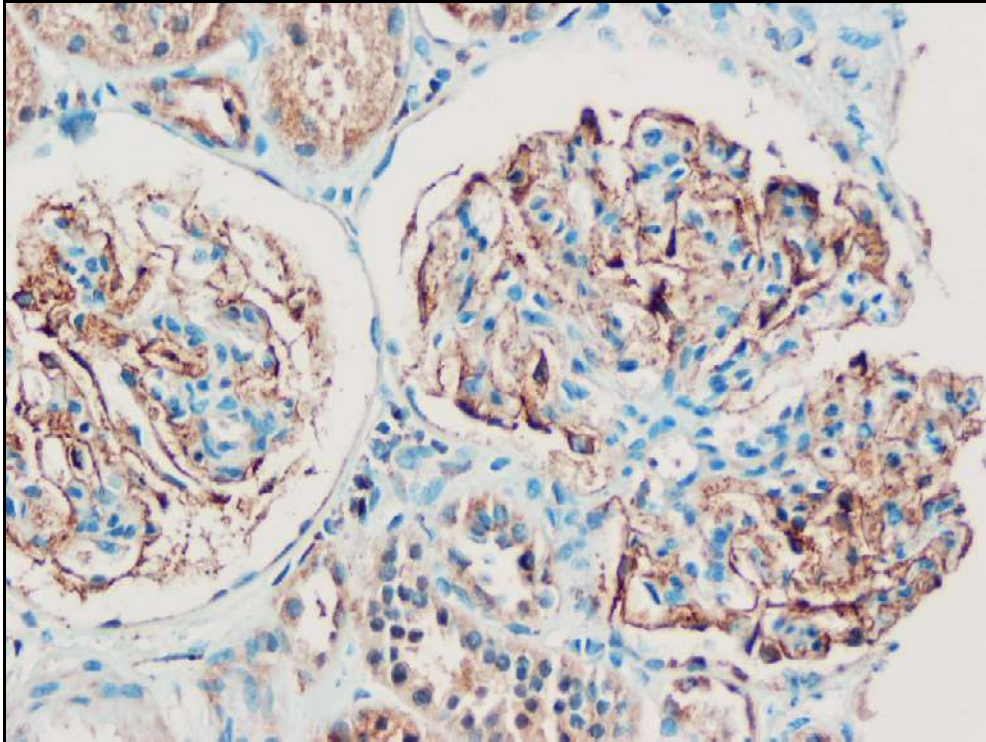
Şekil IV: Nefrin boyanma paternlerinin tanılarına göre karşılaştırılması



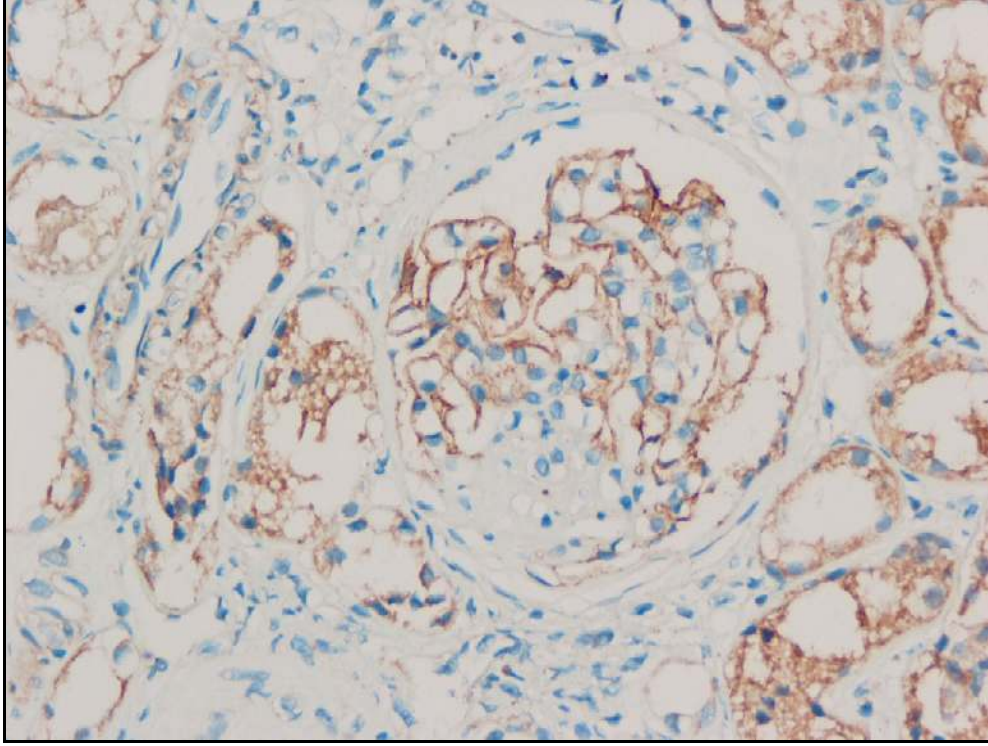
Resim 1: Normal glomerülde nefrin ile lineer boyanma paterni (Nefrin, X400)



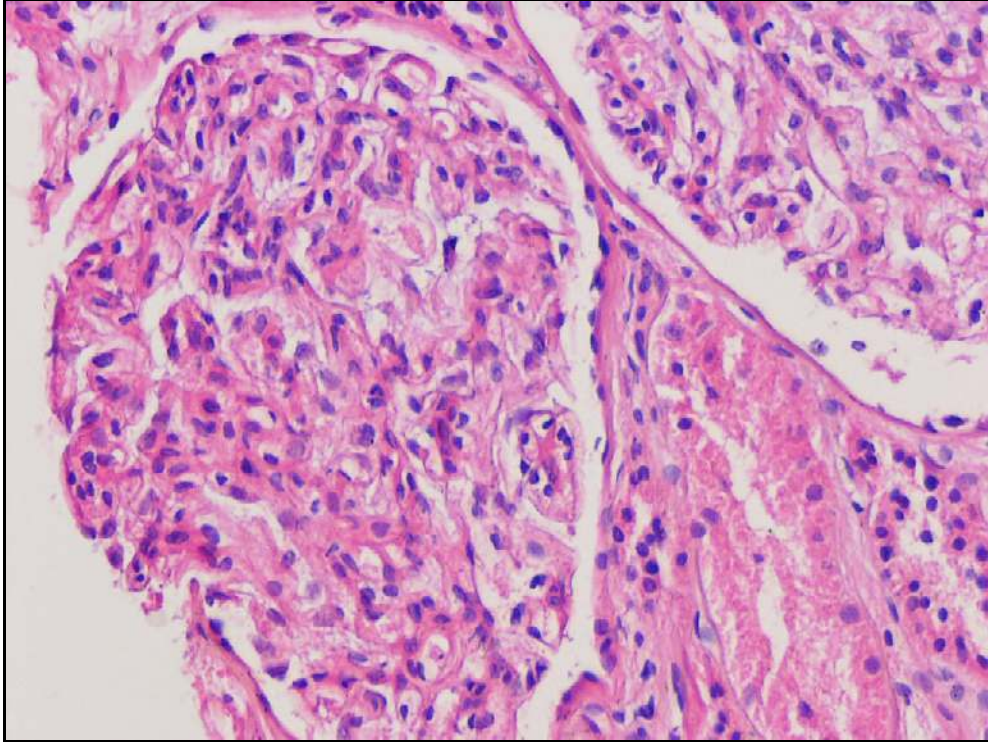
Resim 2: FSGS olgusunda nefrin ile kaba granüler (++) boyanma paterni (Nefrin, X400)



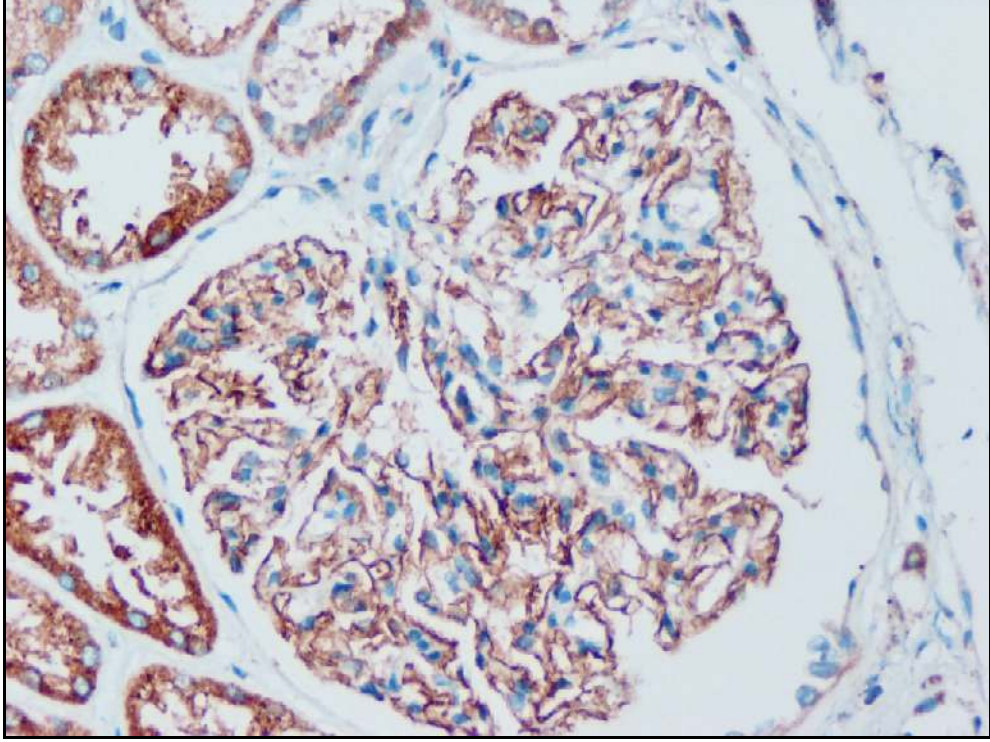
Resim 3: FSGS olgusunda nefrin ile granüler boyanma paterni ve segmental skleroz alanında ekspresyon kaybı (Nefrin, x200)



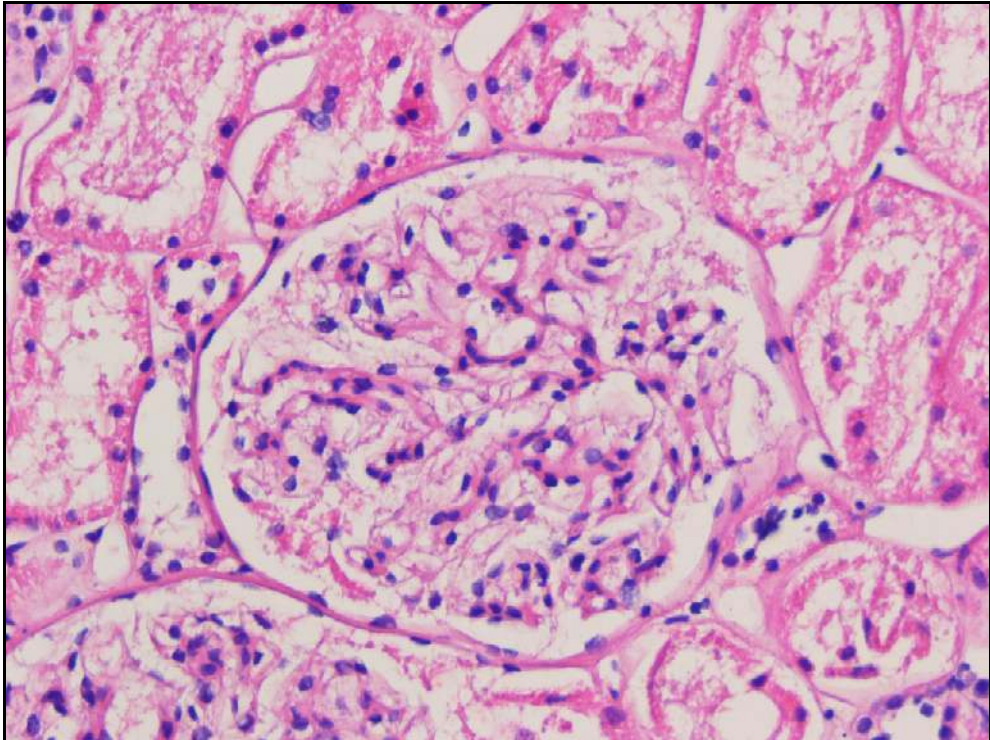
Resim 4: Mezangial proliferasyon (Hematoksilen-eozin, X400)



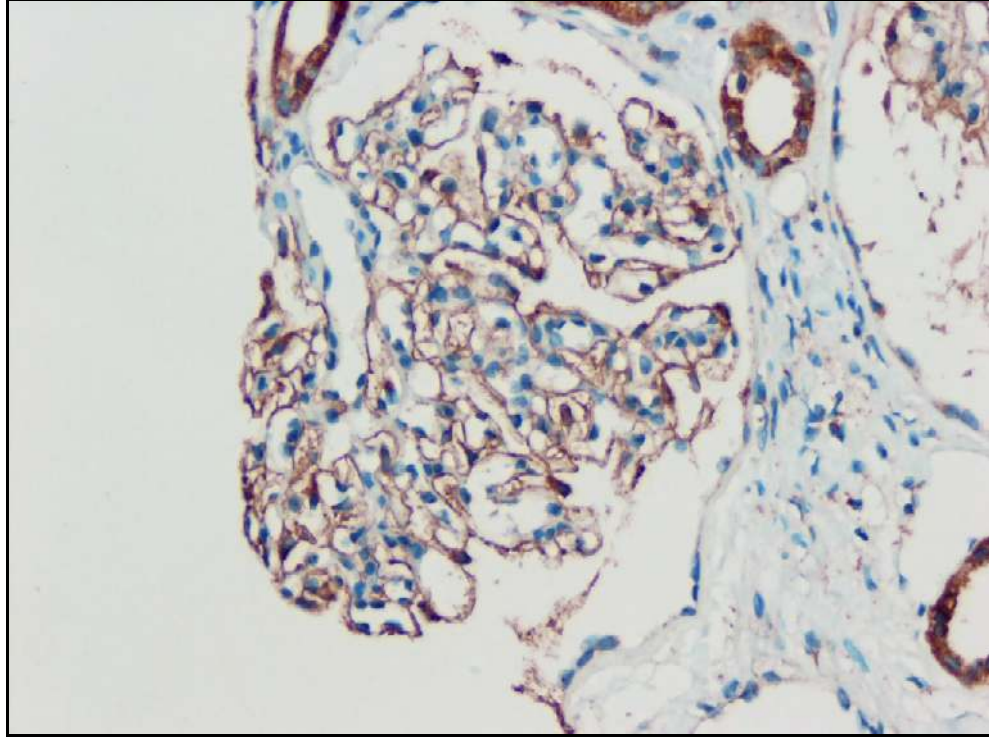
Resim 5: Mezangial proliferasyon olgusunda nefrin ile ince ve yer yer kaba granüler boyanma paterni (Nefrin, X400)



Resim 6: Minimal değişiklik hastalığında normal görünümde glomerül (Hematoksilen-eozin, X400)



Resim 7:Nefrin ile MDH'da ince granüler boyanma paterni (nefrin.X400)



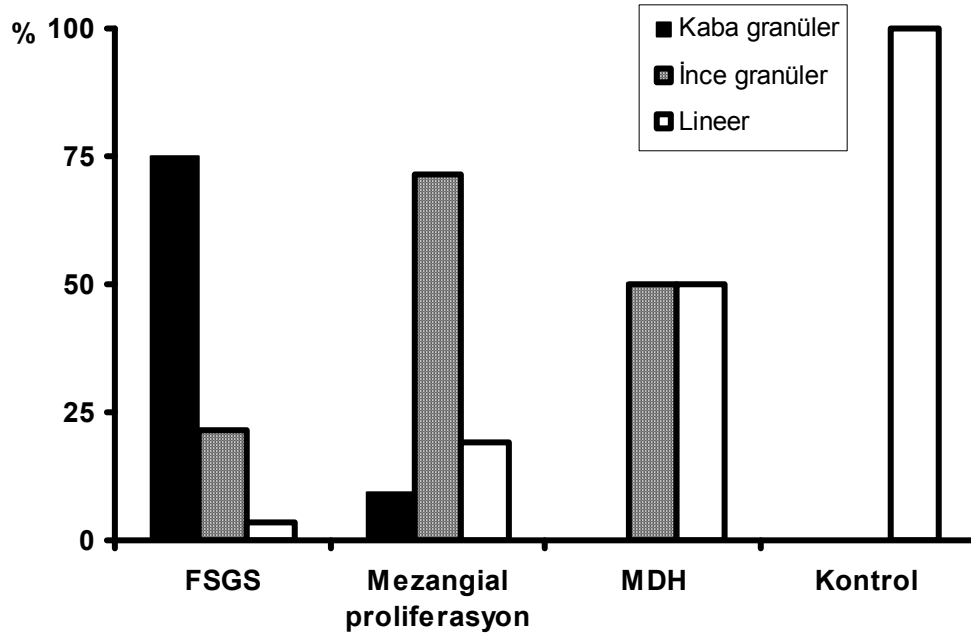
Nefrin boyanma paterni, proteinüri düzeyi, kreatinin klerensi, BUN , kan albumin ve kreatinin düzeyi gibi laboratuvar bulgular ile korele edildiğinde granülarite artışı ile proteinüri düzeyinde ve kan kreatinininde artış ve kreatinin klerensinde azalma arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı.

Tablo V: Boyanma paternlerinin klinik parametrelerle ilişkisi

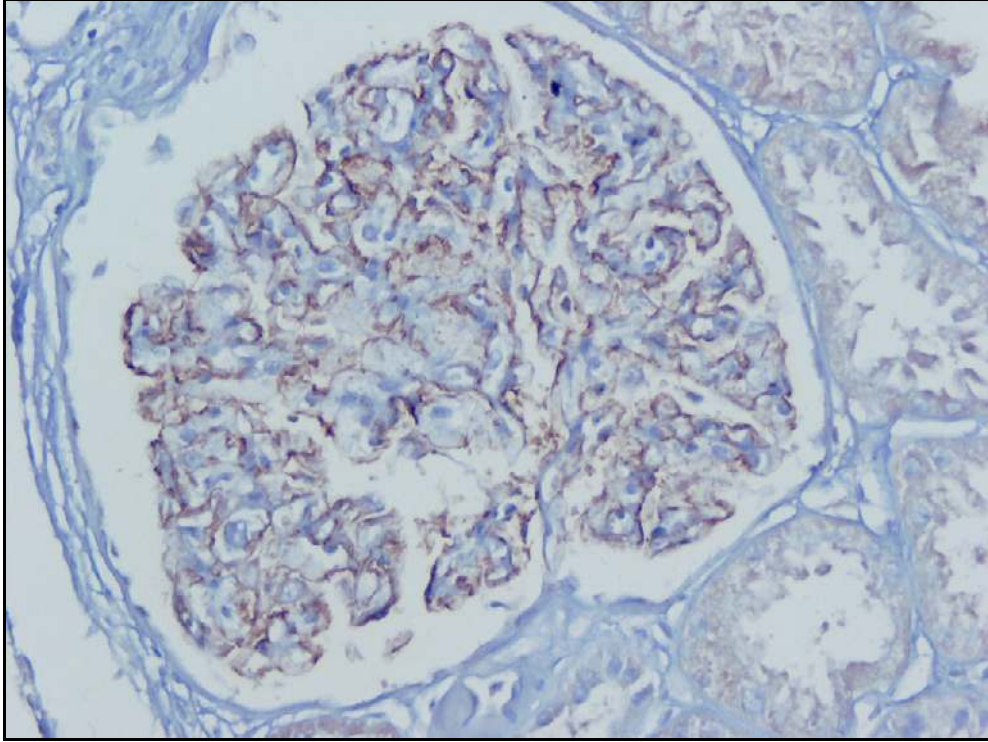
Klinik parametreler	Kaba granüler ekspresyon gösteren grup	Lineer ekspresyon gösteren grup	p değeri
24 saatlik idrarda protein	2659,95	290,00	0,03
Kreatinin klerensi	50,80	16,66	0,009
Kan kreatinini	2,12	0,56	0,03
Kan albumin düzeyi	3,24	3,86	0,174
BUN	41,33	18,00	0,311

Podosin boyanma paterni değerlendirildiğinde kontrol olgularında bazal membranlar boyunca lineer boyanma paterni izlenirken, FSGS olgularının %75'inde kaba granüler, %21,4 'ünde ince granüler, %3,6'sında lineer boyanma paterni izlendi.. Minimal değişiklik hastalığında %50 oranında ince granüler, %50 oranında lineer boyanma paterni saptandı. Mezangial proliferasyonda ise %71,4 oranında ince granüler, %19 oranında lineer, %9,5 oranında ise kaba granüler boyanma paterni görüldü.

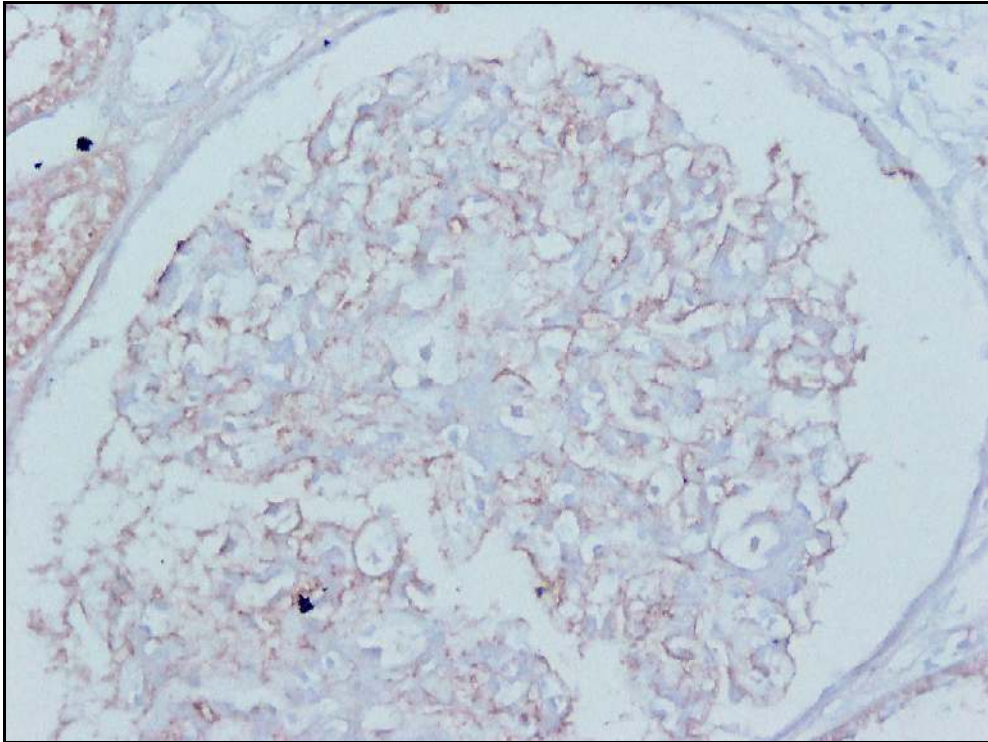
Şekil V: Podosin boyanma paternlerinin tanılara göre karşılaştırılması



Resim 8: MP olgusunda podosin ile kaba granüler boyanma paterni (Podosin, X400)

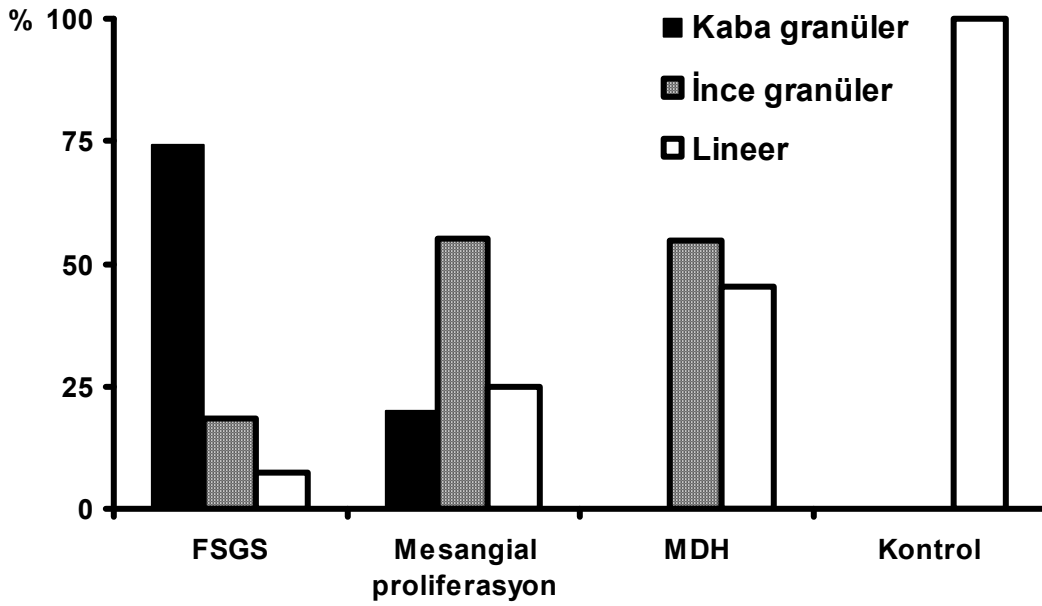


Resim 9: MDH'da podosin ile ince granüler (+) boyanma paterni (Podosin, X400)

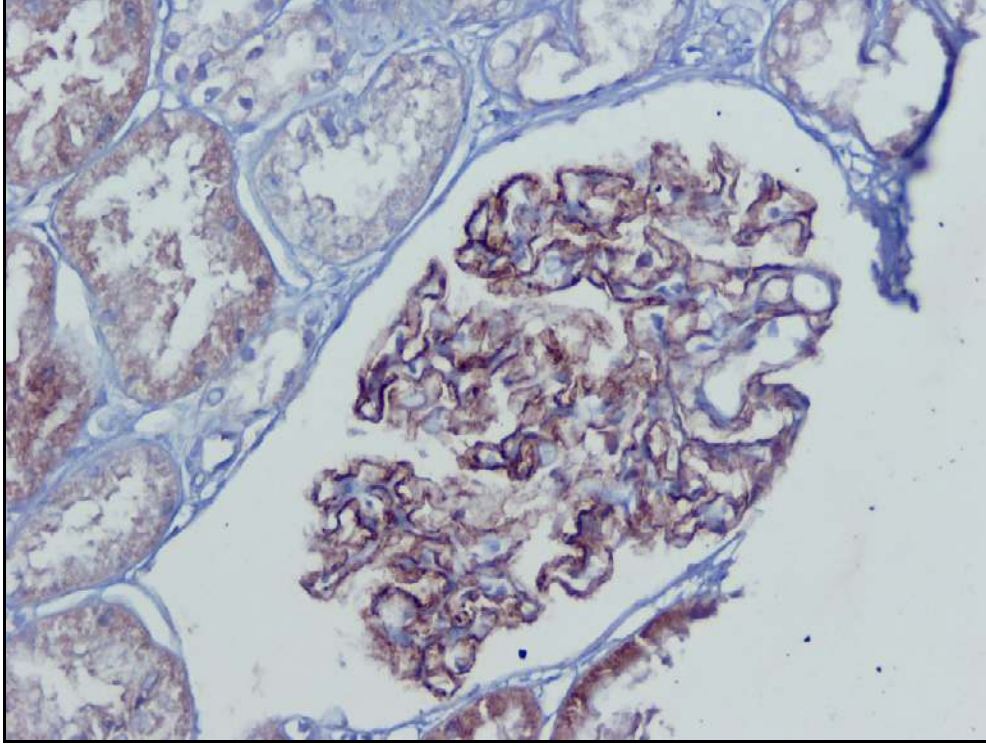


Sinaptopodin boyanma paterni değerlendirildiğinde nefrin ve podosine benzer şekilde, kontrol grubunda lineer boyanma izlenirken FSGS’da %74,1 oranında kaba granüler, %18,5 oranında ince granüler ve %7,4 oranında lineer boyanma paterni izlendi. Minimal değişiklik hastalığında %54,5 oranında ince granüler, % 44,5 oranında lineer boyanma mevcuttu. Mezangial proliferasyon olgularında ise nefrin ve podosinde olduğu gibi FSGS ve MDH arasında yer alan %55 oranında ince granüler, %25 lineer, %20 kaba granüler boyanma paterni görüldü.

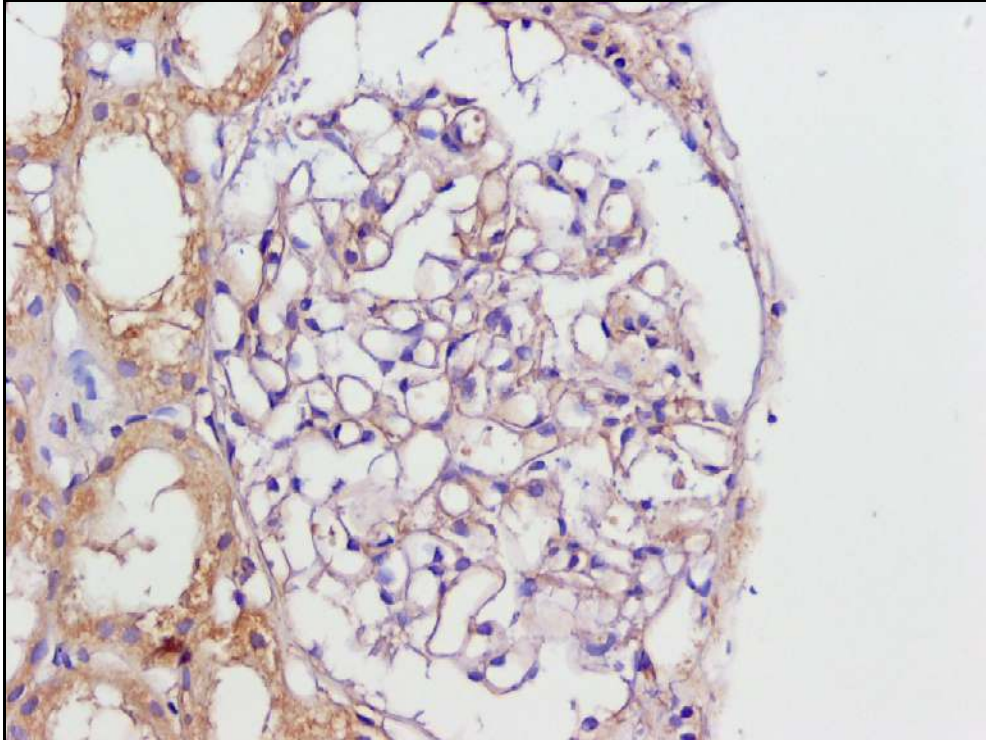
Şekil VI: Sinaptopodin boyanma paternlerinin tanılara göre karşılaştırılması



Resim 10: Sinaptopodin ile kaba granüler boyanma paterni (sinaptopodin, X400)



Resim 11: Sinaptopodin ile ince granüler boyanma paterni (Sinaptopodin, X400)



Nefrin, podosin ve sinaptopodin boyanma paterni açısından FSGS-MP, FSGS-MDH, FSGS-Kontrol, MP-Kontrol ve MDH-Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcut iken ($p=0,000$), MP-MDH grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır. ($p=0,167$)

Nefrin, podosin ve sinaptopodin boyanma paternleri açısından 15 yaş altı çocuk hastalarda ve 15 yaş üstü olgularda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamış olup boyanma paterni çocuk ve erişkinlerde benzerlik göstermektedir.

Nefrin, podosin ve sinaptopodin boyanma şiddetleri karşılaştırıldığında nefrin boyanma şiddetinde hafif azalma mevcut olsa da boyanma şiddeti açısından hastalık grupları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. ($p=0,117$).

Podosin($p=0,028$) ve sinaptopodin($p=0,014$) boyanma şiddetleri açısından gruplar arasında anlamlı fark görülmüştür. Podosin şiddeti, 27'si FSGS, 20'si MP ve 12'si MDH olmak üzere 59 vakada değerlendirilmiş olup FSGS grubu ile kontrol grubu arasında boyanma şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. ($p=0,007$). Ancak MP ve MDH 'da da boyanma şiddetinde hafif azalma mevcut olmakla birlikte bu hastalıklar arasında ve kontrol grubu arasında boyanma şiddeti bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (sırası ile $p=0,049$ ve $p=0,05$).

Sinaptopodin boyanma şiddeti 28'i FSGS, 20'si MP, 12'si MDH olmak üzere toplam 60 olguda değerlendirilmiş olup FSGS ,MP ve MDH'da kontrol gruplarına oranla boyanma şiddetinde anlamlı azalma saptanmıştır (sırası ile $p=0,008$, $p=0,004$ ve $p=0,003$). Hastalık grupları arasında boyanma şiddeti açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Tablo VI: Olguların tanılara göre nefrin, podosin ve sinaptopodin boyanma şiddetlerinin dağılımı

İmmünohistokimyasal boya	Tanı	Boyanma şiddeti (%)		
		(+)	(++)	(+++)
Nefrin	FSGS	6 (20,7)	10 (34,5)	13 (44,8)
	Mezangial proliferasyon	1 (4,8)	12 (57,1)	8 (38,1)
	MDH	2 (16,7)	6 (50,0)	4 (33,3)
	Kontrol	0 (0)	2 (20,0)	8 (80,0)
Podosin	FSGS	4 (14,8)	15 (55,6)	8 (29,6)
	Mezangial proliferasyon	2 (10,0)	11 (55,0)	7 (35,0)
	MDH	1 (9,1)	8 (72,7)	2 (18,2)
	Kontrol	0 (0)	2 (20,0)	8 (80,0)
Sinaptopodin	FSGS	6 (21,4)	13 (46,4)	9 (32,1)
	Mezangial proliferasyon	5 (25,0)	10 (50,0)	5 (25,0)
	MDH	3 (25,0)	7 (58,3)	2 (16,7)
	Kontrol	0 (0)	3 (30,0)	7 (70,0)

Nefrin, podosin ve sinaptopodin şiddeti albuminüri düzeyi, kan kreatinini, BUN, kreatin klerensi gibi klinik parametrelerle korele edildiğinde yalnızca podosin boyanma şiddeti ile kan kreatinin düzeyi arasında orta düzeyde anlamlı negatif korelasyon varlığı dikkati çekmiştir. ($r=-0,481$, $p=0,02$)

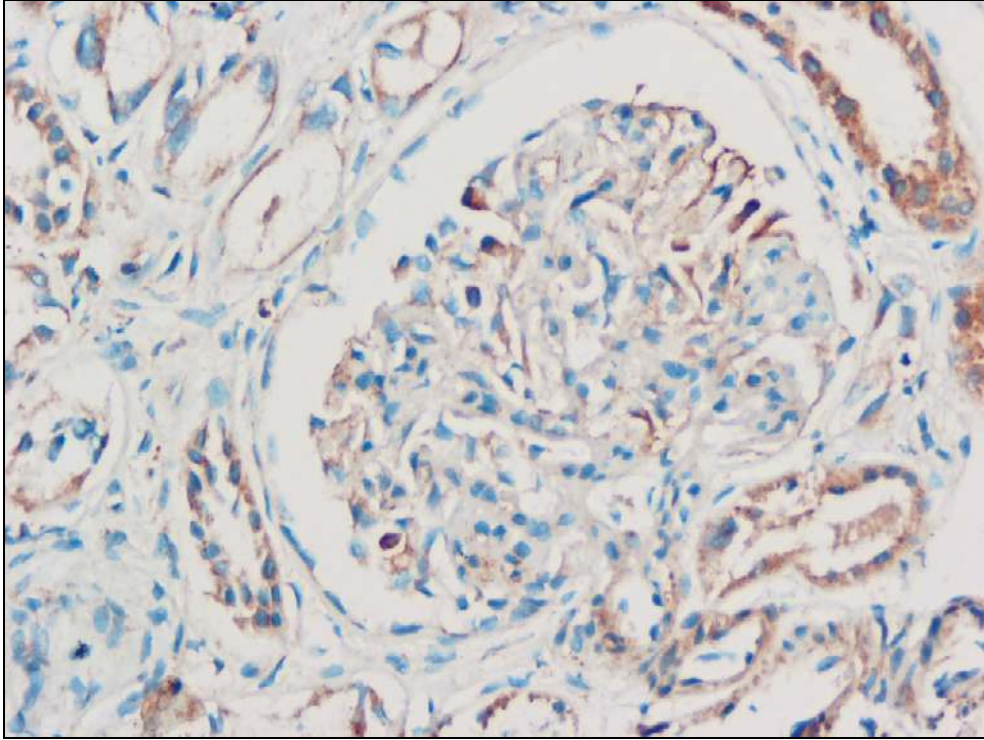
Nefrin, podosin ve sinaptopodin ekspresyon kaybı gösteren glomerül yüzdeleri ve ekspresyon kaybı gösteren ortalama glomerül içi alan yüzdeleri açısından gruplar arasında karşılaştırma yapılmış, yalnızca nefrin ekspresyon kaybı açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,009$). Podosin ve sinaptopodin ekspresyonunda kontrol grubuna göre hafif kayıp olsa da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı saptanmıştır. Nefrin ekspresyon kayıbdaki farklılık FSGS olgularında MDH, MP ve kontrol gruplarına oranla anlamlı derecede azalma ile ilişkili bulunmuştur (p değerleri sıra ile 0,012, 0,014, 0,009).

Nefrin, podosin ve sinaptopodin ekspresyon kaybı albuminüri düzeyi, kan kreatinini, kreatin klerensi, kan albumin düzeyi ve BUN ile korele edildiğinde nefrin ekspresyon kaybı ile kan

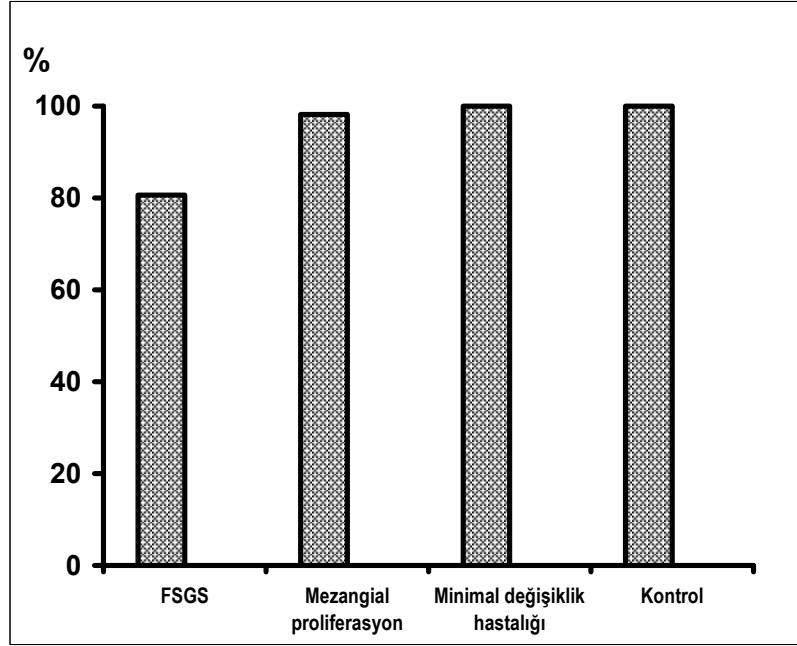
kreatinin düzeyi arasında ileri düzeyde anlamlı pozitif korelasyon varlığı saptanmıştır. ($r=0,780$, $p=0,000$) . Ayrıca nefrin ekspresyon kaybı düzeyi ile BUN düzeyi arasında orta derecede anlamlı pozitif korelasyon ($r=0,419$, $p=0,026$) ve kreatinin klerensi arasında orta derecede anlamlı negatif korelasyon ($r=-0,416$, $p=0,026$) dikkati çekmiştir.

Podosin ekspresyon kaybı ile de kan kreatinin seviyesi arasında ileri düzeyde anlamlı pozitif korelasyon ($r=0,694$, $p=0,000$) saptanmıştır.

Resim 12:FSGS olgusunda nefrin ekspresyon kaybı (nefrin, X400)



Şekil VII: Nefrin eksprese eden glomerül yüzdesinin tanılara göre dağılımı



TGF beta 1 ekspresyonu normal böbrek dokularında ve MDH’da çok seyrek olarak interstisyel inflamatuvar hücrelerde, tübül epitel hücrelerinde ve glomerüllerde yalnızca birkaç adet epitelyal hücrede izlenmekte idi. Ancak FSGS olgularında global sklerotik alanlarda ekspresyon izlenmez iken, segmental skleroz alanları çevresi GEH’de ve nonsklerotik glomerüllerde sıklıkla 3-4 adet podositte , yer yer daha fazla oranda ekspresyon izlendi. Mezangial proliferasyonla karakterli biyopsilerde ise FSGS ve MDH arasında ekspresyon paterni izlendi.

Glomerüllerdeki ortalama TGF beta eksprese eden hücre yüzdesi hastalık grupları ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında gruplar arasında farklılık anlamlı idi ($p=0,004$). Glomerüllerdeki TGF beta 1 eksprese eden ortalama hücre yüzdesinde FSGS olgularında MDH olguları ve kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı miktarda artış saptandı (p değeri sırası ile 0,002 ve 0,001). Ancak FSGS olguları ile mezangial proliferasyon olguları arasında glomerüler TGF beta 1 pozitif ortalama hücre yüzdesi açısından istatistiksel olarak

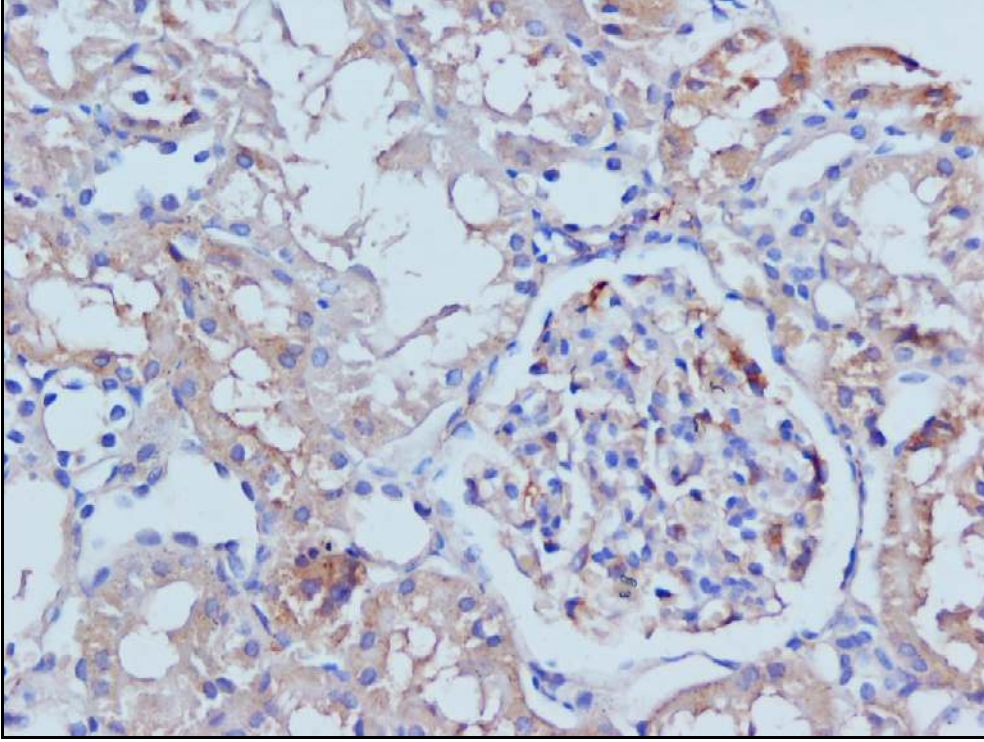
anlamli bir farklılık saptanmadı ($p=0,045$). MP, MDH ve kontrol grubu arasında TGF beta eksprese eden glomerüler hücre yüzdesi açısından anlamli fark saptanmadı.

TGF beta 1 eksprese eden glomerül yüzdeleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli fark saptanmadı ($p=0,615$).

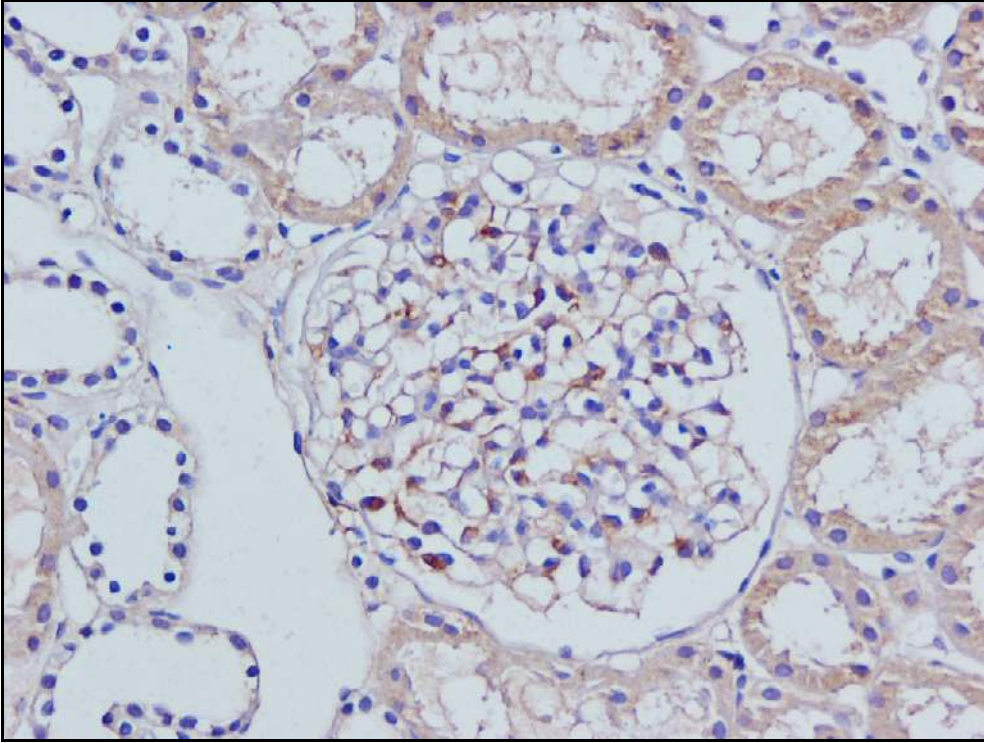
Glomerüler TGF beta eksprese eden hücre yüzdeleri ile histolojik bulgular korele edildiğinde interstisyel inflamasyon, fibrozis ve tübüler atrofi ve TGF beta1 ekspresyonu arasında orta düzeyde anlamli korelasyon mevcuttu. (p değerleri sıra ile 0,05, 0,048 ve 0,005). Yine TGF beta 1 ekspresyonu ile segmental skleroz ($r=0,394$, $p=0,007$), ve global skleroz arasında ($r=0,395$, $p=0,007$) orta düzeyde istatistiksel olarak anlamli korelasyon saptandı.

FSGS ve MDH arasında ekspresyon paterni sergileyen MP ile karakterli olgularda TGF ekspresyon yüzdesi ile kan kreatinin düzeyi arasında çok ileri düzeyde istatistiksel olarak anlamli korelasyon gözlendi ($r=0,806$, $p=0,049$). MP olgularında göze çarpan bir diğer önemli bulgu ekstraselüler mezanjial matriks artışı ile interstisyel inflamasyon ($r=0,435$, $p=0,30$) fibrozis ($r=0,439$, $p=0,28$) arasında orta düzeyde anlamli korelasyon varlığı idi. Hem nefrin, podosin, sinaptopodin boyanma paterni, şiddeti hem TGF beta ekspresyonu açısından FSGS ve MDH arasında kalan MP olgularında mezangial proliferasyon derecesini klinik parametrelerle karşılaştırdığımızda 24 saatlik idrarda protein düzeyi açısından mezangial hücre sayısı 3-4 olan grup ile 4-5 olan grup arasında anlamli farklılık izlenmiştir ($p=0,001$)

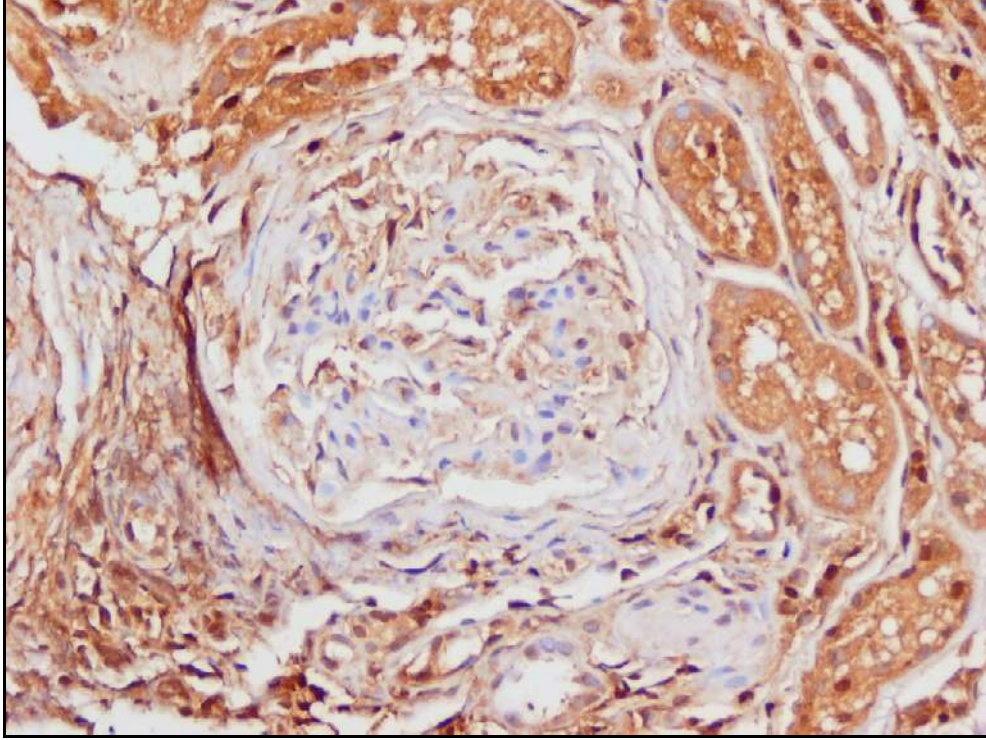
Resim 13: MDH'da TGF beta 1 ekspresyonu (TGF-B1, X200)



Resim 14: MP olgusunda TGF beta 1 ekspresyonu (TGF-B1, X400)



Resim 15: FSGS olgusunda TGF beta 1 ekspresyonu (TGF-B1, X400)

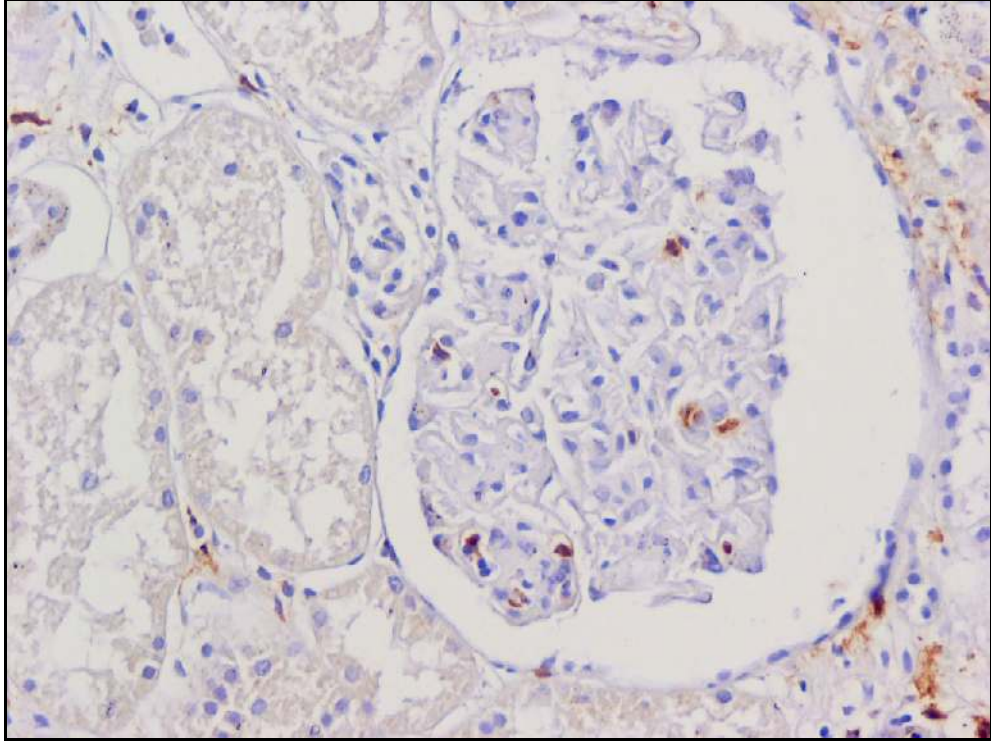


Tablo VII: Mezangial proliferasyon derecesi ile klinik bulguların karşılaştırması

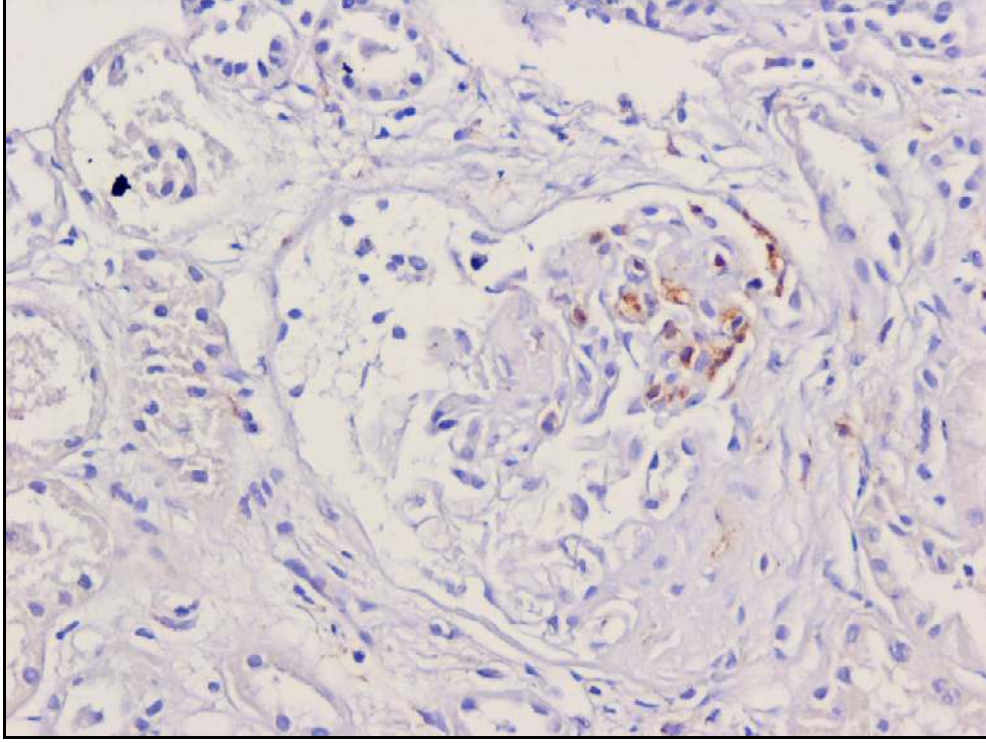
Klinik parametreler	MP=3-4	MP=5-9	p değeri
24 saatlik idrarda protein	2173,85+/-3693,52	5424,44+/-2731,88	0,001
Kan kreatinini	1,51+/-1,22	1,57+/-0,7	0,429
Kreatinin klerensi	77,19+/-43,25	66,94+/-26,84	0,544
BUN	29,37+/-22,18	40,33+/-30,44	0,441
Kan albumin düzeyi	3,79+/-1,25	3,12+/-0,42	0,096

CD 68 ekspresyonu gösteren hücreler içeren glomerül yüzdesi ve ortalama glomerüler CD 68 pozitif hücre yüzdesi değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırası ile $p=0,293$ ve $p=0,097$). CD 68 ekspresyonu FSGS alt tipleri arasında karşılaştırıldığında CD 68 pozitif hücre içeren glomerül yüzdesi ve glomerüler ortalama CD 68 pozitif hücre yüzdesi açısından alt tipler arasında anlamlı fark saptanmadı (sıra ile $p=0,089$ ve $p=0,083$).

Resim 16: MDH'da CD68 ekspresyonu (CD68, X400)

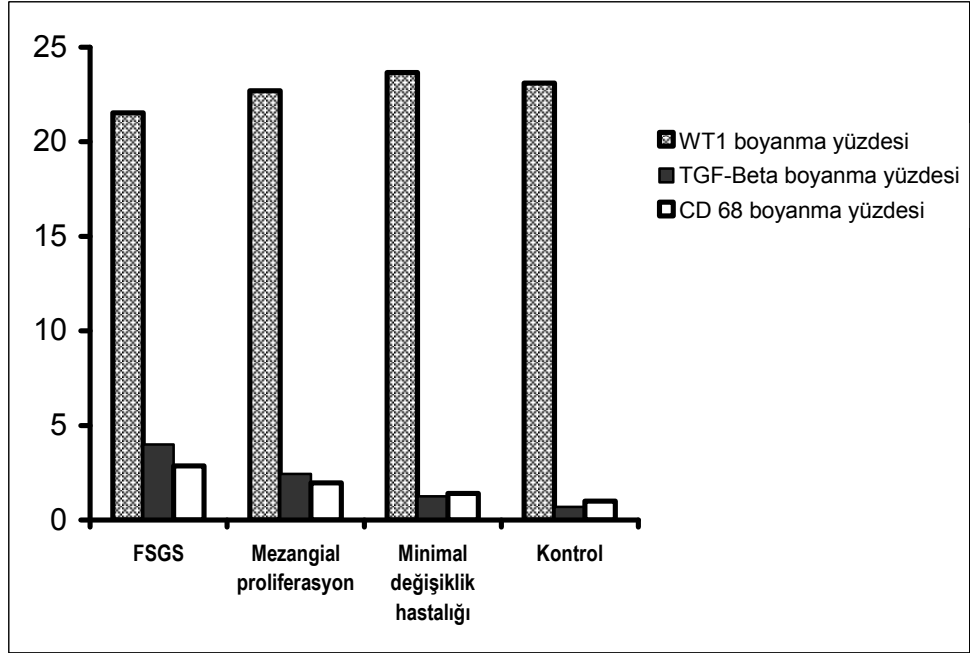


Resim 17: FSGS olgusunda CD68 ekspresyonu (CD68, X400)

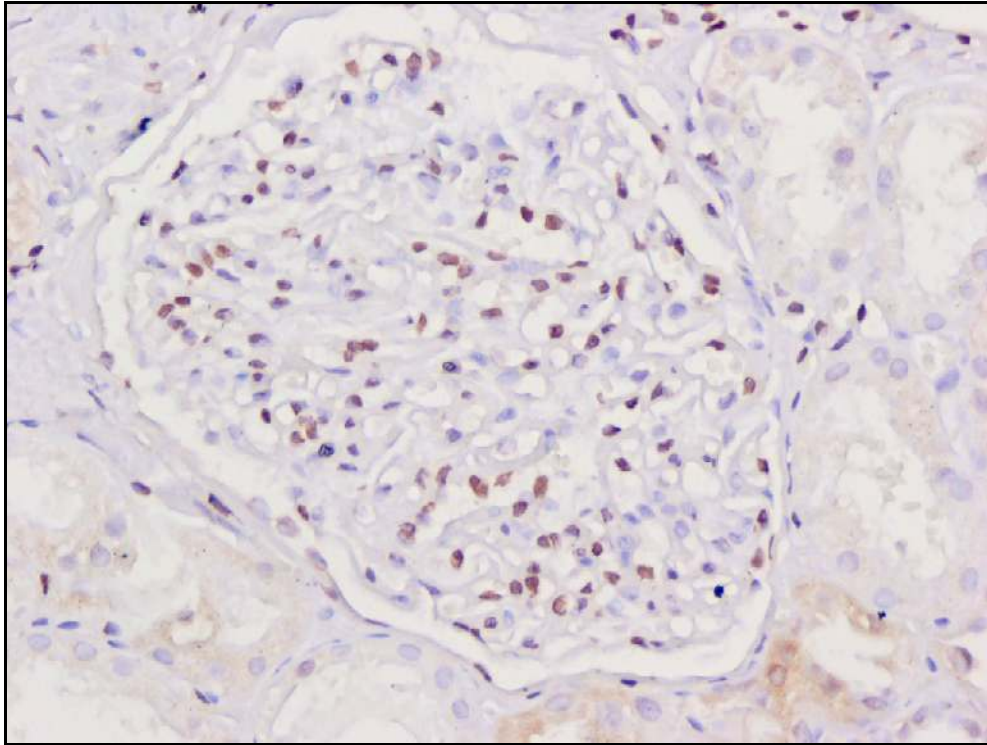


Podositlerdeki nükleer WT 1 ekspresyonu karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,931$). FSGS olgularında diğer gruplara oranla azalmış ekspresyon olsa da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. Bazı FSGS olgularında segmental skleroz çevresi mezar taşı izlenimi veren, ya da bazal membrandan ayrışma aşamasında olan iri, yuvarlak podositlerde azalmış WT-1 ekspresyonu ve bazı podositlerde makrofaj belirleyicisi olan CD 68 ekspresyonu izlendi.

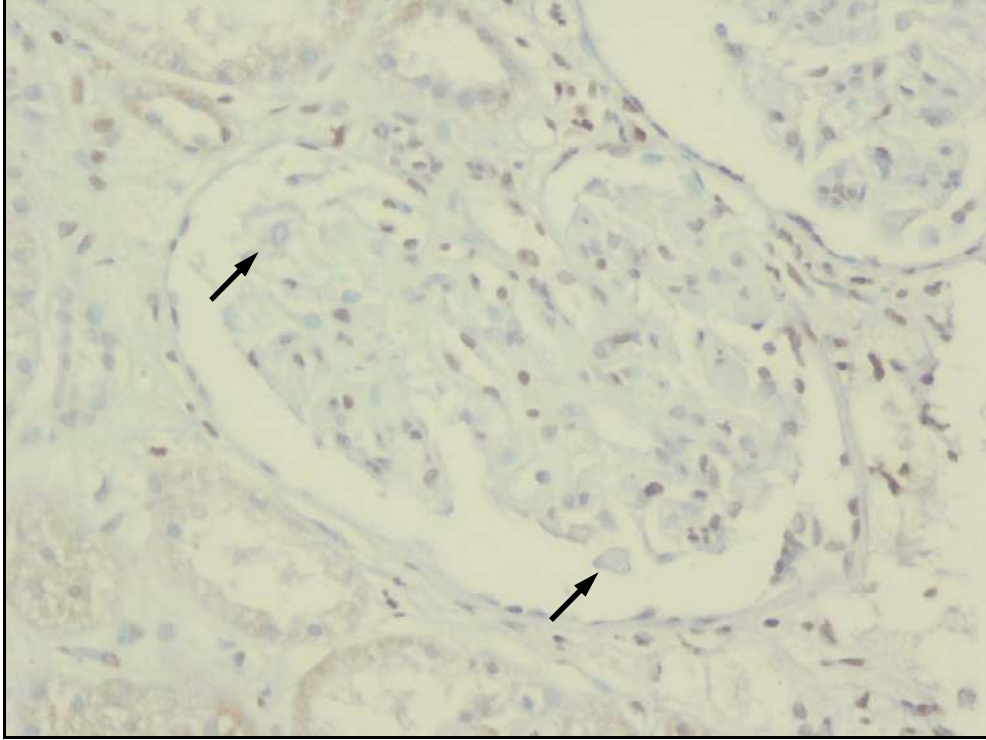
Şekil VIII: WT1, CD68 ve TGF beta 1 eksprese eden ortalama glomerüler hücre yüzdesi



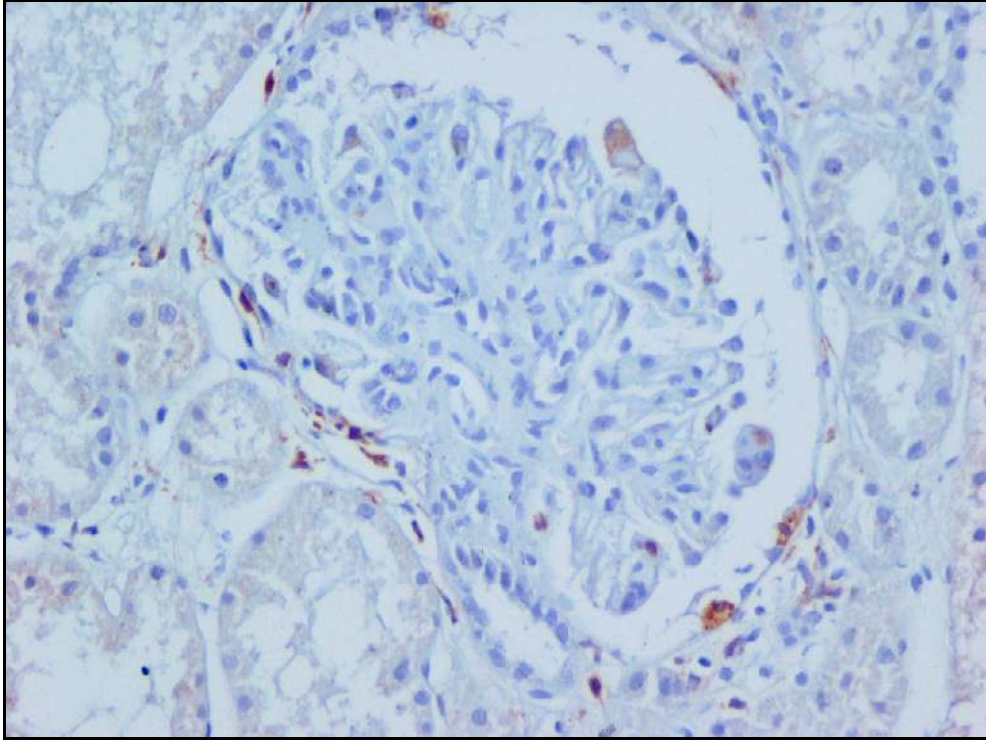
Resim 18: MP olgusunda nükleer WT1 ekspresyonu (WT1, X400)



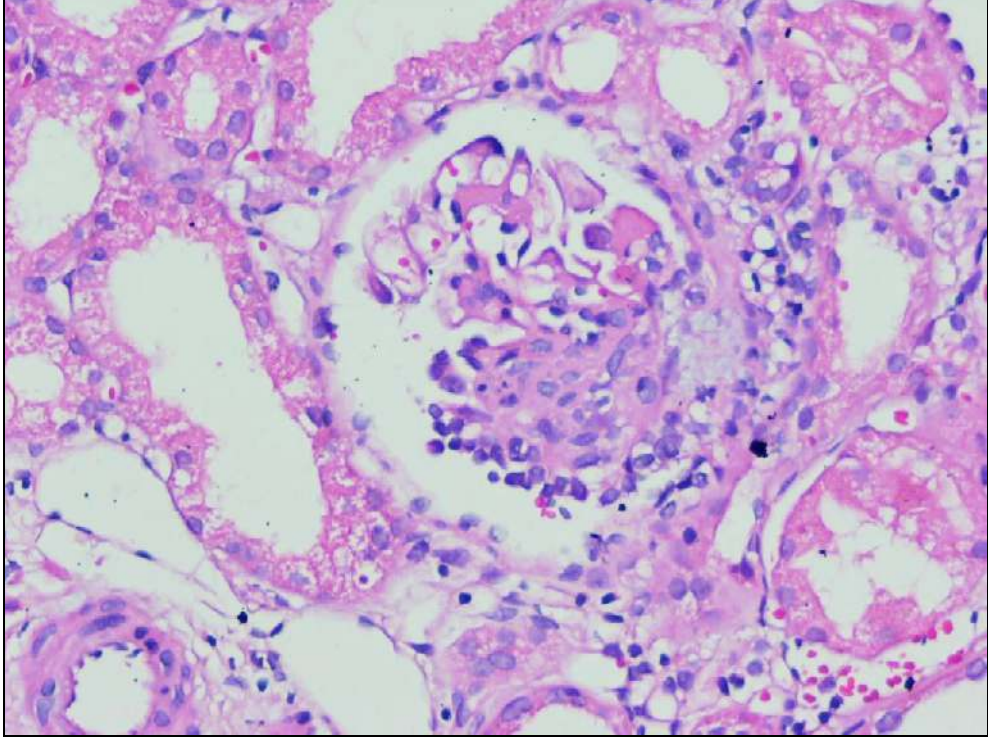
Resim 19: FSGS olgusunda azalmış WT-1 ekspresyonu



Resim 20: GBM'dan ayrıışan birkaç adet podositte CD 68 ekspresyonu



Resim 21:Segmental skleroz üzerinde mezar taşı izlenimi veren podositler (hematoksilen eozin, X400)



TARTIŞMA VE SONUÇ

Fin tipi Konjenital nefrotik sendroma neden olan, nefrini kodlayan NPHS1 gen mutasyonu ayaksı çıkıntılarda silinmeye ve proteinüriye neden olmaktadır. Ayaksı çıkıntılarda silinme ve değişen derecelerde proteinüri pek çok edinilmiş glomerüler hastalıkta ve glomerulonefritlerin hayvan modellerinde de gözlendiğinden edinilmiş böbrek hastalıklarında nefrin ekspresyonu pek çok araştırma için ilgi odağı olmuştur. Slit diyaframda lokalize olan bu moleküldeki yapısal ya da fonksiyonel defektler proteinüride kritik role sahip olabilir. Minimal değişiklik hastalığı ve fokal segmental glomeruoskleroz edinilmiş nefrotik sendromun en sık nedenleri olduğundan ve kimi zaman bu iki antitenin ayırıcı tanısında güçlüklerle karşılaşılabilindiğinden nefrin ekspresyonları karşılaştırılmış ve oldukça farklı sonuçlar ortaya konmuştur.

Furness ve ark. 1999'da dört nefrotik sendrom olgusu (1 membranöz nefropati, 3 MDH) ve 6 kontrol olgusunun her birinden elde edilen birer glomerülde PCR amplifikasyon yöntemini uygulayarak nefrin mRNA miktarında azalma olduğunu saptamışlardır (20). Ancak olgu sayısı az olduğundan ve glomerüler eşit olarak etkilenmediğinden incelemeye alınan tek glomerül ile karar vermek yanıltıcı olabilmektedir.

Patrakka ve ark. 2001 yılında MDH, FSGS, membranöz nefropati, Henoch-Schönlein nefriti, İgA nefriti ve membranoproliferatif glomerulonefrit tanılı 56 olguluk çalışmasında immunhistokimyasal olarak ve bu olguların 17'sine uygulanan in situ hibridizasyon yöntemi ile nefrin ekspresyon paterninde kontrol grubuna göre farklılık olmadığını ortaya koymuşlardır (55). Glomerüllerde kontrol grubuna benzer lineer boyanma paterni izlemiş, yalnızca epitelyal kresentler ve sklerotik alanlarda boyanma olmadığını saptamışlardır. Epitelyal kresent ve skleroz alanlarının proteinüri ile ilişkili olmayıp, normal yapılarda bozulmaya sekonder bu alanlarda nefrin ekspresyon kaybının gözlendiğini öne sürmüşlerdir.

Nefrin hücre adezyon molekülü olup diğer moleküllerle ekstra ve intraselüler bağlantıları mevcuttur. Bu bağlamda sinyal iletiminde önemli role sahip olduğundan nefrin ve slit diyafram komponentlerinin fonksiyonunu engelleyen patolojik süreçler de slit diyaframda proteinlerin varlığına rağmen proteinüriye neden olabilir (77). NPHS 1’de nefrin molekülünde tek bir aminoasit değişikliği gibi minör defektler dahi çok ağır proteinüriye neden olabilmektedir (55).

Patrakka’nın çalışmasına benzer olarak Sangeeta ve ark. da FSGS ve MDH’nı kapsayan 29 olguluk çocuk hasta grubunda ve kontrol grubunda immunhistokimyasal olarak ince granüler/lineer nefrin ekspresyon paterni izlemişlerdir (26). Bu bulgularla nefrin ekspresyon değişikliklerinin çocukluk çağı idiyopatik nefrotik sendromunun belirtisi olmadığı sonucuna varmışlardır .

Huh W ve Tryggvason K. MDH, membranöz GN, İGA nefropati ve lupus nefriti tanılı 8 olguda poliklonal nefrin antikoru ile immun elektron mikroskopik çalışma yapmışlardır (32). Normal böbreklerde anti nefrin antikoruna bağlı altın partikülleri podosit sitoplazması, hücre membranına yakın alanlar ve ayaklı çıkıntılar arası boşluklarda izlenmiştir .Ayaklı çıkıntılarda silinme olan alanlarda partikül sayısının oldukça azalmış olmasına karşın, intakt bölgelerde normal böbrekteki benzer sayı ve dağılımda partikül varlığını ortaya koymuşlardır . Normal böbrekteki oranla ayaklı çıkıntı genişliğinin hasta gruplarında yaklaşık iki kat artmış olduğunu göstermişlerdir.Ayaklı çıkıntılarının aralıklarında bulunan ortalama partikül sayısı glomerülo nefrit olguları ve normal kontrol olgularında önemli değişiklik göstermemesine rağmen, podosit uzantıları altındaki bazal membranda 1000nm gibi belirlenen her uzunluk başına düşen partikül sayısının glomerülo nefrit olgularında normale oranla oldukça azalmış olduğunu gözlemişlerdir . Bu sonuçlar eşliğinde nefrinin yalnızca konjenital nefrotik sendromda değil edinilmiş glomerüler hastalıkların patogeneğinde

de rolü olduğu görüşünü belirtmişlerdir. İmmunhistokimya, in situ hibridizasyon, PCR gibi yöntemlerle farklı sonuçlar elde edilmesinin nedenini ise glomerülonefritlerde ayaksı çıkıntılarda silinmenin homojen olmamasına , bu yapılarda ciddi silinmenin gerçekleşeceği sürece kadar nefrin ekspresyonundaki değişimin fark edilememesine bağlamışlardır. Ancak ayaksı çıkıntılarda silinmenin gözleendiği podositlerdeki sitoskeletal değişiklikler de nefrin ekspresyonunu baskılayabilir. Familial idiyopatik nefrotik sendromda saptanan podosin ve alfa aktinin-4 mutasyonu ve hayvan deneylerinde gösterilmiş olan, konjenital nefrotik sendroma neden olan CD2AP mutasyonu bu olasılıklara örnek teşkil etmektedir (68).

Wernerson ve Söderberg 13 MDH olgusunda immunhistokimyasal ve semi kantitatif immunelektronmikroskopik olarak nefrin dağılımını incelemişler ve sonuçların ayaksı çıkıntılarda silinme ile korele olduğunu savunmuşlardır (81). İndirekt immunfloresan yöntemi ile nefrinin intra ve ekstraselüler kısımlarına yönelik antikorlarla ağır proteinürisi olan olgularda belirgin granüler patern, tedavi alan ve hafif proteinürisi olan olgularda mikst lineer ve granüler patern saptamışlardır. Kontrol böbrek dokusunda slitler arası mesafeler oldukça az olduğundan lineer boyanma izlenirken, MDH’da ayaksı çıkıntılar incelendiğinde bu mesafeler artacağından granüler görünüm izlenmektedir yorumunu yapmışlardır.

İmmun elektron mikroskopik olarak ise ayaksı çıkıntılarda silinme ne kadar fazla ise granüler paternin de o derecede yoğun olduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak ayaksı çıkıntılarda silinmenin yaygınlığı ile nefrin granüleritesi arasında direk korelasyon, serum albumin konsantrasyonu ile ayaksı çıkıntılarda silinme arasında ters yönde korelasyon varlığına dikkat çekmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da granülerite artışının proteinüri düzeyi ile anlamlı düzeyde korele olduğu ve yine kaba granüler boyanan olguların lineer boyanan olgulara göre serum kreatinin

düzeylerinde anlamlı olarak yükselme ve kreatinin klerenslerinde ise anlamlı oranda azalma olduğu saptanmıştır.

Elektron mikroskopik olarak Tryggvason'un çalışmasına benzer şekilde ayaksı çıkıntılarda silinme olan alanlarda slit sayısının ve ayaksı çıkıntılarda incelme olan ve olmayan alanlarda mikrometrekare total podosit alanı başına düşen nefrin miktarının azaldığını göstermişlerdir. Total podosit alanı başına nefrin ekspresyon miktarında azalma olması bu durumun yalnızca ayaksı çıkıntılarda silinmeye bağlı olmadığını göstermektedir.

Wernerson ek olarak çevrede halen varlığını koruyan slitlerde nefrin miktarının değişmediğini, slit membran yapısı için belirli bir miktarda nefrin konsantrasyonu gerekliliğini belirtmiştir. Ayrıca ayaksı çıkıntılarda incelme olan alanlar çevresi slitlerde nefrin miktarında azalmaya eşlik eden sitoplazmik yeniden dağılım üzerinde de durulmuştur. Yeniden dağılım sürecinde nefrin molekülü hücre membranına integre olur ya da intraselüler resirkülasyona katılır ya da idrar yolu ile kaybedilir. Yeniden sentezlenen nefrinle birlikte slit membranlar hızlıca tekrar yapılır. Ayaksı çıkıntılarda silinmeye neden olan etken ortadan kaldırıncı MDH'da olduğu gibi geri dönüşümlü olarak podositler eski halini alabilir (69).

Podositlerde nefrin yeniden dağılımı da primer edinilmiş nefrotik sendromda proteinüriye neden olan bir diğer mekanizma olabilir. Nefrin ekspresyon ve lokalizasyonu glomerulonefrit tiplerinde altta yatan farklı patogenetik mekanizmalara bağlı değişkenlik gösterebilir.

Doublier ve ark. primer edinilmiş nefrotik sendromlarda podositlerde meydana gelen nefrin yeniden dağılım mekanizmasının proteinüriye neden olduğunu öne sürmüşlerdir (19). 13 membranöz GN, 10 adet MDH, 7 adet FSGS ve 16 adet kontrol olgusundan oluşan çalışmada indirek immunfloresan yöntemi ile primer hastalığa bağlı olmaksızın hastalık gruplarında kontrol grubuna oranla yaygın ekspresyon kaybı olduğunu ve lineer paternin oldukça granüler bir paterne dönüştüğünü göstermişlerdir. Glomerulonefritlerin patogenezinde yeri olan ve

hücre iskeleti yapısını etkileyebilen faktörlerin nefrin yeniden dağılımına neden olabileceğini in vitro olarak glomerül epitel hücre kültüründe göstermişlerdir. Hücre iskeletindeki aktivasyon nefrinin ekspresyonunu etkileyerek plazma membranından ekstraselüler alana doğru yer değiştirmesine neden olabilmektedir.

Deneysel olarak agregat oluşturan IgG4 antikorunun, TNF alfa, membran atak kompleksi ve püromisinin bu yolla nefrinin hücre yüzey ekspresyonunda azalmaya ve dökülmeye neden olduğu gösterilmiştir. Agregat oluşturan IgG4 F-aktinin normal selüler organizasyonunda bozukluğa , stres iplikçiklerinde kayba ve periferel aktin lokalizasyonuna neden olmaktadır. İmmunfloresan çalışmada saptanan granüler boyanma paterninin de nefrin molekülünün normal lokalizasyonu olan slit diyaframdan plazma membranına doğru yer değiştirmesi ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir. İmmunfloresan boyanma şiddeti dijital görüntü analizi yöntemi ile semi kantitatif olarak değerlendirilmiş ve MN, MDH ve FSGS olgularında kontrollere oranla önemli ölçüde azalma olduğu ve PCR ile nefrin mRNA ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca hastalık grupları arasında anlamlı fark olmaması nedeni ile boyanma şiddetinde azalmanın primer hastalık değil proteinüri düzeyi ile ilişkili olduğunu da saptamışlardır.

Spesifik antikorlar ile nefrin etkileşimi nefrin molekülünün hücre yüzeyinde yama tarzında distribüsyonuna , nefrin içeren immün komplekslerin dökülmesine neden olmaktadır. Örneğin agrege IgG antikoru ile nefrin arası etkileşim heterotopik asosiasyondan çok neonatal Fc reseptörü ile gerçekleşmekte , bu etkileşim hücre iskeletinde yeniden düzenlenmeye ve buna bağlı nefrin molekülünde dağılım değişikliğine yol açmaktadır (19).

Edinilmiş proteinürik hastalıklarda podosit protein ekspresyon kaybı, antikor, immün kompleks, sitokin, kompleman komponenti gibi stimuluslara sekonder podosit zedelenmesinin sonucu olarak da ortaya çıkıyor olabilir.

Byoung Kwon ve ark. immunhistokimyasal olarak monoklonal ekstraselüler nefrin antikoru ile MDH 'da ince granüler boyanma paterni, FSGS'da daha dağınık ve kaba granüler boyanma paternine dikkat çekmişlerdir (37). MDH olgularında visseral glomerüler epitel hücrelerinde noktasal boyanma izlemiş olup, normal böbrekte ve FSGS olgularında bu epitelyal hücrelerde boyanma saptamamışlardır.

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde FSGS olgularında kaba granüler, MDH olgularında ince granüler ve lineer boyanma paterni izledik . Ek olarak mezangial proliferasyonla karakterli olgularda ise FSGS ve MDH arasında kaba granüler ve ince granüler boyanma paterni izledik. Yani boyanma paterninin tanısal açıdan yardımcı olabileceğini hem de podosit zedelenmesini yansıtabileceğini saptadık.

Byoung ayrıca immunelektronmikroskopik olarak da MDH'da altın partiküllerin silinmiş olan ayaksı çıkıntılarda izlenmeyip visseral epitel hücrelerinde dağınık halde bulunduğunu , intakt slit diyaframdaki partikül sayısının kontrol grubu ile farklılık göstermediğini ortaya koymuşlardır. Ancak FSGS olgularında ayaksı çıkıntılarda silinme olan alanlarda, visseral epitel hücrelerinde ve hatta intakt olan ayaksı çıkıntılarda da kontrol grubuna oranla partikül sayısında belirgin azalma olduğu öne sürülmüştür. Bu bulgular eşliğinde proteinürik hastalıklarda bir spektrum şeklinde anormal glomerüler nefrin ekspresyonu olduğu, MDH'da nefrin yeniden dağılım mekanizmasının, FSGS'da nefrin proteininde belirgin azalmanın etkili olduğu fikri önem kazanmıştır. Ayaksı çıkıntılarda silinme sürecinde slit diyafranda lokalize proteinlerin apikale doğru yer değiştirmesi ya da kaybı neticesinde granüler boyanma paterninin izlendiği fikrini savunmuşlardır. Ek olarak MDH'da visseral glomerüler epitel hücrelerinde izlenen ince granüler boyanma paterninin nefrinin hedef bölgesi olan filtrasyon slitlerinin sıklığında azalma sonucunda visseral glomerüler epitel hücrelerinde yeni nefrin sentezine bağlı olduğunu belirtmişlerdir. FSGS olgularında izlenen irregüler granüler

paternin de nefrin molekülünde yer değiştirmeye sekonder olabileceğini, ayaksı çıkıntılarda retraksiyon ve mikrovillus formasyonu ile nefrinin filtrasyon yarıklarından mikrovillüsler doğru yer değiştirdiği öne sürülmüştür. FSGS olgularında ayrıca izlemiş oldukları GBM boyunca yama tarzında ya da segmental kayıpların ve VGEH’de nefrin kayıplarının bu hastalık grubunda nefrin sentezinde azalmayı işaret ettiğini belirtmişlerdir. Nefrin mRNA seviyesinin proteinüri ile değil glomerüloskleroza yaygınlığı ile orantılı olduğunu ve azalmış nefrin ekspresyonunun ağır proteinüriden çok glomerüler yapısal bozulmayı yansıttığını savunmuşlardır . Ancak Wernerson proteinüri düzeyi ile ayaksı çıkıntılarda silinme yaygınlığının korele olduğunu göstermiştir (81). Furness’in çalışmasından farklı olarak FSGS olgularında nefrin mRNA düzeyinde azalma saptansa da MDH’da mRNA seviyesinde kontrol grubuna oranla azalma saptamamışlardır. Ancak bu farklılık her iki çalışmada da olgu sayısının oldukça az olması ve olguların glomerüllerde heterojen dağılım gösterebilen podosit zedelenmesini yansıtmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Srivastava ve ark. MCD, FSGS , CNF ve erken yaşta nefrotik sendrom ve santral sinir sistemi anomalileri ile seyreden Galloway –Mowat sendromu vakalarında immunhistokimyasal olarak nefrin, sinaptopodin ve GLEPP1 ekspresyonunu değerlendirmiş, CNF’da nefrinde tamamen kayıp, sinaptopodin ve GLEPP1’de azalma saptarken, FSGS ,MDH ve GMS’da bu proteinlerin üçünde de ekspresyonda azalma saptamıştır (74). Yine podosit zedelenmesinin sinaptopodin, nefrin ve GLEPP1 ekspresyonunda azalma ile ilişkili olduğu görüşündedir. Her üç hastalık grubunda ve her üç proteinde de benzer şekilde azalma olmasının tek bir mutasyona bağlı olma olasılığına ihtimal vermemektedirler.

Protein ekspresyonunda azalmanın FSGS ve GMS’da MDH’a oranla daha belirgin olma nedenini ise ilk iki gruptaki podosit zedelenmesinin daha yaygın olmasına bağlamışlardır. Klaas Koop ve ark. FSGS, MDH, IgA nefropatisi, diabetik nefropati ve lupus nefritinden

oluşan oldukça heterojen ve 48 olguluk geniş çalışmalarında nefrin yanı sıra podosin, CD2-AP ve podokaliksin ekspresyonunu immunhistokimyasal olarak kantitatif değerlendirmişlerdir (39). IgA nefropatisi dışındaki antitelerde nefrin, podosin ve podokaliksin ekspresyonunda azalma, PCR yöntemi ile de mRNA seviyelerinde artma saptamışlardır.

Elektron mikroskopik olarak ölçülen podosit genişliğinin nefrin ve podosin protein miktarı ile anlamlı düzeyde negatif yönde korelasyon gösterdiğini, proteinüri düzeyi ile de pozitif yönde korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Proteinüri ve podosit zedelenmesine kompanseuar yanıt olarak mRNA sentezinde artış olduğu belirtilmiştir.

Schmid ve ark, idiyopatik proteinürik hastalıklarda sinaptopodin, podoplanin, GLEPP-1, WT-1, nefrin ,podosin mRNA ekspresyonunu değerlendirmişler ve kontrol grubuna oranla mRNA seviyesinde anlamlı artış saptamamışlardır. Yine ekspresyon seviyeleri ile proteinüri ve serum kreatinin seviyesi arasında korelasyon izlememişlerdir. Podosit ilişkili moleküllerdeki hedef gen/housekeeper gen oranına dayanan ekspresyon profilinin kategoriler arasında net ayırım yapamadığını ortaya koymuşlardır. Bu prosedüre göre glomerüllerdeki farklı miktardaki housekeeper cDNA ekspresyon oranlarını değiştirmektedir. Yine Glomerüllerdeki podosit sayısında azalma ya da mezangial hücrelerde artış podosit spesifik mRNA /housekeeper oranını değiştirecektir. Bu nedenle podosit spesifik gen ekspresyon oranlarının anlamlı olabileceği hipotezi ile podosin mRNA'nın sinaptopodin mRNA'ya oranını değerlendirmişler ve FSGS ile MDH arasında anlamlı farklılık saptamışlardır (64).

Tablo VIII: MDH ve FSGS vakalarında nefrin ekspresyonuna ilişkin literatür çalışmaları

Seriler	Yaş	MDH	FSGS	Nefrin ekspresyonu
Furness ve ark. (1999)	Erişkin	3	0	mRNA 'da azalma
Srivastava ve ark. (2001)	Çocuk	3	3	Glomerüler boyanma şiddetinde azalma
Patrakka ve ark. (2001)	Çocuk	11	2	Boyanma farklılığı yok
Doublier ve ark. (2001)	Erişkin	10	7	Granüler boyanma ya da boyanmada kayıp
Huh ve ark. (2002)	Erişkin	1	0	Yalnızca ayaksı çıkıntılarda kayıp olan alanlarda Au partiküllerde kayıp
Wang ve ark. (2002)	Erişkin	4	11	Nefrin boyanmasında kantitatif kayıp
Kim ve ark. (2002)	Erişkin ve çocuk	7	14	Granüler boyanma, mRNA'da azalma
Wernerson ve ark. (2002)	Erişkin ve çocuk	13	0	Granüler patern, nefrinde azalma

Famlyal form FSGS olgularında podosin, alfa aktinin mutasyonlarının tanımlanması, glomerüler filtrasyon bariyerinde CD 2AP varlığının gösterilmesi gibi gelişmeler proteinüri mekanizmasında yalnızca nefrinin değil bu proteinlerin bağlı olduğu podosit hücre iskeleti ile ilgili değişimlerin de proteinüri patogeneğinde rolü olabileceği fikrini akla getirmektedir. Podosin nefrin ve CD2AP ile bağlantılıdır ve bu kompleks slit diyaframı aktin hücre iskeletine bağlayan fonksiyonel ünedir (31). Sinaptopodin lineer, prolinden zengin bir protein olup podosit ayaksı çıkıntılarda aktin mikro filamanları ile bağlantılıdır, hücrenin şeklinin korunmasında ve motilitede rol alır.

Horinouchi ve ark. MDH, FSGS, IgA nefropatisi tanılı 42 olguluk çalışmalarında immunhistokimyasal olarak podosin ve sinaptopodin ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. MDH’da remisyon ya da aktif faz gözetmeksizin ya da tedavi alıp almamalarına bağlı olmaksızın podosin ekspresyonunda azalma olmadığını saptamışlardır. Ancak FSGS vakalarının %74’ünde podosin ekspresyonunda azalma izlenmiştir (29). Podosin ekspresyonunu değerlendirmenin MDH ve FSGS ayırıcı tanısında yararlı olabileceği fikri öne sürülmüştür. Podosin ekspresyonunda değişiklik saptanmayan FSGS olgularında steroide yanıt ve tam remisyon gibi iyi prognoz bulgularının görüldüğünü belirtmişlerdir. FSGS ‘un farklı nedenleri olduğunu, podosin ekspresyonunda azalmanın anlamının açık olmadığını ancak podosin ekspresyon kaybının primer ya da sekonder filtrasyon bariyer zedelenmesine bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir. IgA nefritinde ise ekspresyonun değişmediğini gözlemişlerdir. Podosin ekspresyonu sinaptopodin ile karşılaştırıldığında da benzer bulgular edinilmiştir.

Srivastava ve ark. idiyopatik nefrotik sendromlu hastalarda sinaptopodin ekspresyonunu immunhistokimyasal yöntem kullanarak karşılaştırmış, FSGS olgularında kontrol grubuna oranla belirgin azalma saptamakla birlikte Horinouchi’den farklı olarak MDH’da da

sinaptopodin ekspresyonunda anlamlı derecede azalma gözlemişlerdir (73). MDH'da lineer yer yer ince granüler boyanma paterni, minimal segmental kesinti, azalmış boyanma şiddeti izlenirken, FSGS'da segmental patern, yama tarzında ve kaba granüler boyanma paterni ve boyanma şiddetinde azalma izlenmiştir. Bu çalışmada önemli nokta diffüz mezangial hiperplazi (DMH) içeren olgularda FSGS ve MDH arasında izlenen boyanma paternidir. Görüntü analizi yöntemi ile dijital ortamda değerlendirilen glomerüllerdeki boyanma yüzdesi ve yoğunluğuna bağlı olarak FSGS ve MDH olgularında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır.

Horinouchi, Barisoni ve Kemeny'nin çalışmalarında olduğu gibi MDH'da sinaptopodin ekspresyonunda azalma saptanmamasını bu çalışmalardaki kantitatif analiz eksikliğine bağlamışlardır (7,29,36). DMH histolojik ve klinik olarak FSGS ve MDH arasında bulunan bir antitedir. Sinaptopodin ekspresyonu açısından da arada yer aldığı saptanmıştır. Başlangıç biyopsileri MDH ya da DMH olan FSGS'a progresyon gösteren dört hastada ilk biyopsideki ekspresyon paterni FSGS'ye benzer olmayıp MDH yönünde boyanma paterni göstermiştir. Bu nedenle ilk biyopsideki ekspresyon paterni MDH ya da DMH'nin FSGS'ye progresyon gösterebileceği yönünde fikir yürütmemizi engellemektedir. Ancak olgu sayısının azlığı nedeni ile bu metodu uygulama dışı bırakmak da doğru değildir.

MDH, DMH ve FSGS'un aynı spektrum içerisinde devamlılık gösteren antiteler olduğu yönünde görüşler mevcuttur (45,73). Hastalığın ciddiyeti de bu spektrumda giderek artmaktadır. Sinaptopodin ekspresyonu steroide iyi yanıt veren olgularda daha fazla olmasına rağmen MDH olgularına ait biyopsi kısıtlılığı nedeni ile boyanma şiddetine bakarak steroide yanıtı öngörmek yanıltıcı olabilir.

Sinaptopodin ekspresyon kaybının podosit kaybına bağlı olup olmadığını göstermek amacıyla Kemeny ve Srivastava sinaptopodinde azalmaya WT 1 ekspresyonunda azalmanın yani

podosit kaybının eşlik etmediğini göstermişlerdir (36,74). Sinaptopodinde azalmanın immünolojik zedelenme ya da immunsupresif tedaviye bağlı olmadığı hipotezini ortaya koymuşlar ve bu hipotezi nefrin gen mutasyonu ile karakterli CNF olgularında da sinaptopodin ekspresyonunun azaldığını göstererek desteklemişlerdir. Podosit proteinlerinden herhangi birindeki değişimin bağlı bulunan diğer proteinleri de dereceli olarak etkileyerek kaybına neden olduğu belirtilmektedir. Sinaptopodin kaybı primer patofizyolojik mekanizma olmasa da sekonder fenomen olarak podosit zedelenmesini yansıtmaktadır.

Bizim çalışmamızda da nefrin, podosin ve sinaptopodin ile benzer boyanma özelliklerinin izlenmesi podosit zedelenmesinin ya da podosit proteinlerinin herhangi birindeki değişimin birbiri ile bağlantılı olan bu moleküllerde kademeli olarak yer değiştirme ya da kayıp şeklinde değişikliğe neden olabileceği görüşü ön plana çıkmıştır. Ekspresyon kaybının, boyanma şiddetine azalmanın ya da granülarite artışının klinik parametrelerle korelasyonu ile bu değişikliklerin podosit zedelenmesinin yaygınlığını yansıttığı sonucuna varılmıştır. Her ne kadar boyanma paternleri açısından gruplar arasında belirgin fark saptansa da ekspresyon şiddeti ya da ekspresyon kaybı açısından gruplar arasında çok da anlamlı fark saptanmaması ve immunhistokimyasal değerlendirmenin subjektif olması nedeni ile bulgular kesin tanıdan çok tanıyı destekleyici niteliktedir. Ancak bulgular podosit zedelenmesini yansıttığından hastalığın yaygınlığının ve derecesinin ortaya konmasında oldukça önem taşımaktadır.

Sonuç olarak slit diyafram ilişkili proteinlerin ve mRNA ekspresyonunun değerlendirilmesi etiopatogeneze yönelik çok açık sonuçlar vermese de hastalığın tanısı, aktivitesi ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesi gibi konularda yardımcı olabilmektedir. Işık mikroskopik olarak segmental sklerozun saptanamadığı olgularda, eşlik eden tübülointerstisyel inflamasyon, fibrozis varlığı ve destekleyici olarak nefrin, podosin ya da sinaptopodin ile dağınık granüler boyanma paterni, ekspresyon kaybı gibi bulgular podosit zedelenmesinin ciddiyeti, yaygınlığı

ve altta yatan FSGS gibi progresif hastalığın göstergesi olabilir. Her ne kadar klinikte tedaviye yanıt derecesine göre immunsupresif tedavi modaliteleri düzenlense de hastalığın yaygınlığının belirlenmesi ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde bu bulgular önem taşımaktadır. Etiolojiye yönelik yapılan genetik çalışmalar ise tedaviyi yönlendirmek açısından oldukça önemlidir. Genetik defektin var olduğu hasta grubunda transplantasyon sonrası rekürrens sıklıkla beklenmediğinden steroidde yanıt vermeyen olgularda daha toksik tedavilere başlamadan yapılacak genetik analiz tedaviye yaklaşımı belirleme açısından yararlı olacaktır.

FSGS ve MDH ‘nın patogeneze yönelik diğer bir araştırma konusu periferik kanda artmış sitokin düzeyleri nedeni ile T hücre ilişkili glomerüler zedelenme ve T hücre ilişkili kemokinler , sitokinler olmuştur.

Strehlau ve ark. nefrotik düzeyde proteinürisi olan 53 çocuk hastanın renal biyopsilerinde PCR yöntemi ile TGF beta 1, interleukin 2(IL 2), IL 4 intra renal gen ekspresyonunu analiz etmişlerdir (75). FSGS olgularında MDH’den anlamlı olarak yüksek oranda TGF beta 1 ve sitotoksik T lenfosit efektörleri olan fas-ligand, granzyme B ve perforin transkripsiyonu saptanmıştır. Öte yandan T hücre büyüme faktörü olan IL2 ve T hücre aktive edici sitokinler olan IL15 ve IL7 transkripsiyon artışı izlenmemiştir . TGF beta 1 ve fas ligand ekspresyonu FSGS’de olduğu gibi progresif renal zedelenmeye neden olabilmektedir. Kanai ve ark. FSGS olgularında üriner TGF beta 1 atılımında artış olduğunu saptamışlardır (35).

Yamamoto ve ark, ekstraselüler matriks akümüülasyonunun olmadığı MDH ve ince bazal membran hastalığında immunhistokimyasal olarak TGF beta’nın üç izoformunun da kontrol grubuna benzer çok seyrek ve zayıf ekspresyon gösterdiğini, ekstraselüler matriks akümüülasyonu olan IgA nefropatisi, diabetik nefropati, lupus nefriti ve FSGS’da glomerüler

ve tübülointerstisyel ekspresyonun oldukça arttığını göstermişlerdir (82). Farklı etiolojilere rağmen ekstraselüler matriks artışı neticesinde glomerüloskleroz, tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis gelişimi ve bu fibrotik süreçte artmış TGF beta ekspresyonunun ortak patojenik yol olduğunu öne sürmüşlerdir . TGF betanın glomerüler ve tübülointerstisyel fibrozis sürecinde rolü olduğu görüşü uzun yıllar ön planda olmasına rağmen progresif renal hastalıkta daha farklı rolleri de mevcuttur. Ekstraselüler matriks artışı ya da değişikliğinin diferansiye renal hücre ölümüne yol açtığına ilişkin fibrosentrik görüşü destekleyen deneysel model yoktur. Renal fibrozis nefron kaybına yol açmadığına göre podosit ve tübül epitel hücre kaybına neden olan TGF betanın indüklediği apoptozis ve transdiferansiyasyon mekanizmaları gündeme gelmiştir.

Podositopati grubu hastalıklarda en erken bulgu olarak izlenen ayaksı çıkıntılarda silinmeyi izleyerek vakuolizasyon, psödokist formasyonu, bazal membrandan ayrışma ve podosit kaybı şeklinde ilerleyen podosit zedelenmesi progresyon göstergeleridir. Yine primer ya da sekonder fokal segmental glomerüloskleroz ve eşlik eden tübülointerstisyel fibrozis kronik progresif renal hastalıklarda yaygın olarak görülmektedir.

Proliferasyon, diferansiyasyon, apoptozis, immun yanıt gibi pek çok fonksiyonu olan TGF beta'nın progresif renal hastalıkta glomerüler ve tübüler epitel hücre apoptozisi ve epitelial-mezenkimal transdiferansiyasyon görevi de son zamanlarda önem kazanmıştır (11). TGF beta heteromerik transmembran reseptörleri ve intraselüler sinyal yolağı olan SMAD proteinleri aracılığı ile hedef gen aktivasyonunda görev alır. TGF beta ve Smad 7 'nin apoptozisteki sinerjistik etkisi in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir (63). Skleroze glomerüler progresif podosit kaybı ile karakterlidir (42). Yine tübüler atrofi, dilatasyon ve perivasküler inflamasyon sürecinin öncesinde TGF betanın indüklediği apoptozis mevcuttur. Neilson ve ark. TGF betanın etkisi ile tübül epitel hücrelerinin (myo)fibroblastlara

transdiferansiye olduğunu öne sürmüştür (58). Progresif renal hastalığın bir diğer göstergesi glomerüler ve peritübüler mikrovaskülerizasyon kaybıdır. TGF beta ve trombospondin 1 mikrovasküler endotelial hücre apoptozisi ve peritübüler kapiller kaybında etkilidir (51).

Goumenos ve ark FSGS, lupus nefriti, IgA ve membranöz nefropati gruplarını içeren ve renal fonksiyonları normal olan 50 hastalık çalışmalarında immunhistokimyasal olarak apoptozis ilişkili bcl-2 ve bax protein ekspresyonunun glomerülofrit tiplerine bağlı olmaksızın kontrol grubuna oranla arttığını ve TGF beta 1 ekspresyonu ile korele olduğunu ortaya koymuşlardır (21). TGF beta'nın tübüler, interstisyel ve glomerüler ekspresyon artışı ağır proteinüri ile ilişkili bulunmuştur.

Kim ve ark, 15 idiyopatik FSGS ve 6 kontrol biyopsisinde immunhistokimyasal olarak TGF beta 1, trombospondin 1 ve TGF beta tip 2 reseptör ekspresyonunu değerlendirmiş ve kontrol grubuna oranla anlamlı derecede arttığını saptamıştır. Kontrol grubunda glomerüllerde TGF ekspresyonu saptanmamıştır. FSGS olgularında nonsklerotik glomerüllerde birkaç podositte boyanma saptanmış iken sklerotik segmentleri çevreleyen podositlerde orta ya da kuvvetli derecede TGF ekspresyonu saptamışlardır. İn situ hibridizasyon yöntemi ile de TGF beta 1 ve TGF beta 2 reseptör mRNA seviyesinde artış olduğu da gösterilmiştir.

Sklerotik segmentleri saran glomerüler epitelyal hücrelerde podosit belirleyicisi olan WT 1 nükleer ekspresyonunun olmadığını belirtmişlerdir (38). Yine glomerül bazal membranı boyunca lineer boyanma paterni sergileyen GLEPP-1 ekspresyonunun FSGS olgularında hem sklerotik alanlarda , hem de nonsklerotik glomerüllerde segmental olarak izlenmediğini gözlemişlerdir. Podosit spesifik belirleyiciler olan WT 1 ve GLEPP-1 ile boyanma kaybını ise glomerüler epitelyal zedelenmenin TGF beta sinyal kaskatını başlattığı hipotezine dayandırmışlardır. TGF beta latent kompleksinin aktivasyonunda trombospondin-1, plazmin ve serbest oksijen radikalleri, GEH'de eksprese olan alfa 5 beta 6 integrin önemlidir.

Bizim çalışmamızda TGF beta 1 ekspresyonunun FSGS olgularında MDH'a oranla anlamlı derecede artmış olduğunu saptadık. FSGS olgularında tübüler ve interstisyel artmış TGF ekspresyonu, TGF eksprese eden glomerüler epitelyal hücre yüzdesi ile interstisyel inflamasyon , fibrozis ve tübüler atrofi arasında orta düzeyde anlamlı korelasyon varlığı da TGF'nin progresyonda multifonksiyonel özelliğini ortaya koymuştur. MP ile karakterli olgularda TGF ekspresyon artışı ile kan kreatinin düzeyinde artış arasında anlamlı düzeyde korele olması TGF ile hastalığın ciddiyeti arasında ilişki olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda ayrıca değerlendirdiğimiz WT-1 ekspresyonu FSGS olgularında Kim'in çalışmasına benzer şekilde ancak çok az bir kısmında sklerotik segment çevresindeki podositlerde WT-1 ekspresyon kaybı izledik. Bu seyrek podositlerde izlediğimiz CD 68 ekspresyonu ise podositlerde fenotipik değişim olabileceğini gösterdi.Genel olarak matür podosit belirleyicisi olan WT-1 eksprese eden ortalama glomerüler epitelyal hücre yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da FSGS'da MDH ve MP'a oranla azalma saptandı. WT-1 renal ve gonadal gelişimde rolü olan transkripsiyon faktörüdür ve podosit fonksiyonunun sağlanmasında da yeri vardır (40). Mutasyonel hastalıkları kalıtsal FSGS'de yer almaktadır. Ayrıca WT 1 ekspresyon kaybı podosit kaybına ya da podositlerdeki fenotip değişikliğine bağlıdır. FSGS olgularında MDH ve MP'a oranla WT-1 eksprese eden glomerüler hücre yüzdesinin bir miktar azalması da apoptozisin eşlik ettiği podosit kaybı ile ilişkili olabilir.

Barisoni ve ark kollapsing glomerülopati ve HIV ilişkili nefropatili olgularda WT-1, CALLA,C3b reseptör, GLEPP-1, podokaliksin gibi matür podosit diferansiasyon belirleyicilerinde kayıp olduğunu göstermişlerdir (7). İdiyopatik kollapsing form FSGS ve HIV ilişkili nefropatilerde MDH ve membranöz nefropatiden farklı olarak podositlerde geri dönüşümsüz ultrastrüktürel değişiklikler olduğunu belirtmişlerdir. Ki 67 proliferasyonunun

da kollapsing FSGS ve HIV nefropatisinde daha yüksek olduğunu fenotipik değişim gösteren podositlerde aynı zamanda hiperplazi olduğunu da saptamışlardır.

Barisoni ve Yang benzer şekilde bu süreci disregülasyon olarak nitelendirmiştir. Yang kollapsing form FSGS ve HIVAN’de immunhistokimyasal olarak anormal WT-1 dağılımı, podosit belirleyicilerinde yaygın kayıp izlemişlerdir. Disregülasyonun proliferasyonla birlikte olduğunu saptamışlardır. FSGS olgularında ise segmental lezyonların çevresindeki podositlerde proliferasyon olmaksızın fenotipik değişikliklerin görülebildiğini tespit etmişlerdir (83). Bariety ve ark, transplantasyon sonrası relaps olan 6 FSGS olgusunda podosit belirleyicileri immunhistokimyasal olarak çalışmışlar ve kollapsing varyant ile selüler varyantta belirgin olarak ekspresyon kaybı saptamışlardır. Yine segmental skleroz gösteren glomerüller üzerindeki mezar taşı izlenimi veren, bazal membrandan ayrışma aşamasında olan ya da bowman mesafesinde serbest halde bulunan büyük, yuvarlak, veziküle podositlerin WT-1 ekspresyonundan çok sitokeratin (AE1/AE3) ya da CD 68 ekspresyonu ya da mikst boyanma paterni gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Buna göre podositler transdiferansiasyon mekanizması ile epitelyal ya da makrofaj benzeri özellik kazanmaktadır (5).

Ohtaka ve ark ise normal podositlerin WT-1 ve vimentin eksprese eden mezenkimal hücrelere benzediğini ve özellikle selüler FSGS ‘de bu hücrelerde Pax 2 ve sitokeratin ekspresyonu izlenmesi nedeniyle mezenkimal-epitelyal transformasyonun söz konusu olduğunu belirtmişlerdir (52). Renal gelişim ve glomerüller epitelyal hücrelerde fenotipik regülasyon için gerekli olan Pax 2’nin re-ekspresyonunun podositlerde fenotipik değişikliğe neden olduğu ileri sürülmüştür.

Bizim çalışmamızda FSGS olguları baskın olarak NOS ve perihiler varyant olup sadece 1 selüler ve 1 tip varyant mevcut idi. Bu nedenle selüler ya da kollapsing varyantlarda sık görülen podosit hiperplazisi, fenotip değişikliği nedeni ile CD 68 ekspresyonu ya da

varyantlar arasında WT1 ekspresyonunda farklılık izlemedik. Az sayıda olguda podosit kaybı nedeni ile WT-1 ekspresyonunda azalma , bazal membrandan ayrışma, mezar taşı görünümü, birkaç podositte CD 68 pozitifliği saptadık. CD 68 ekspresyonu FSGS olgularında MDH'a oranla bir miktar yüksek olmakla birlikte bu durum intrakapiller köpüksü hücrelerin Schonholzer'in de belirttiği gibi (66) FSGS olgularında relatif olarak daha fazla izlenmesi ile ilişkili idi.

Sonuç olarak FSGS gerek podosit kaybı gerekse fenotip değişikliği ile nefron kaybına neden olan toksik, metabolik, enfeksiyöz, immünolojik, hemodinamik hastalıklar ve yapısal ya da fonksiyonel değişikliklerin progresyonunda ortak yoldur (12,61). Yukarıda adı geçen belirleyiciler, podosit zedelenmesini veya kaybını yansıtabilmesi , hastalığın progresyonu ya da yaygınlığı konusunda fikir verebilmesi ve patogenezi açıklayabilmesi açısından önem taşımaktadır.

ÖZET

Podosit ilişkili moleküllerin glomerüler filtrasyon bariyerindeki rolünün belirlenmesi ve konjenital nefrotik sendromda ağır proteinüriye neden olan nefrin gen mutasyonunun saptanması ile birlikte edinsel nefrotik sendrom olgularında da bu proteinlerin ekspresyonunun değerlendirilmesi önem kazanmıştır. Bu çalışmamızda podosit zedelenmesinin ortak olduğu minimal değişiklik hastalığı, fokal segmental glomerüloskleroz ve mezangial proliferasyonla karakterli olgularda “slit diyafram” proteinlerinden nefrin, podosin ve sinaptopodin ekspresyonunu ve klinik parametrelerle korelasyonunu inceledik. 10’u kontrol olmak üzere toplam 84 olguluk çalışmamızda FSGS olgularında nefrin, podosin ve sinaptopodin ile benzer şekilde büyük oranda kaba granüler, MDH olgularında ince granüler MP ile karakterli olgularda ise FSGS ve MDH arasında büyük oranda ince granüler ve kaba granüler boyanma gözlemlendi. Podosin boyanma şiddeti ve nefrin ekspresyon kaybı ile kreatinin klerensi ve kan kreatinin düzeyleri arasında korelasyon dikkati çekti.

Ekstraselüler matriks artışı ve apoptoziste rolü olan TGF-beta 1’in podositlerde ekspresyonu karşılaştırıldığında ise FSGS olgularında diğer gruplara oranla hafif artış izlendi. TGF ekspresyonu ile segmental, global skleroz, interstisyel inflamasyon, fibrozis ve tübüler atrofi arasında korelasyon saptandı. Glomerüler WT-1 ekspresyonu FSGS olgularında diğer gruplara oranla podosit kaybını yansıtır şekilde hafif derecede azalmış idi. Biri selüler varyant olmak üzere yalnızca birkaç olguda WT-1 eksprese etmeyen, bazal membrandan ayrışma aşamasında olan podositlerde CD 68 ekspresyonu izlendi..

Sonuç olarak yukarıda adı geçen belirleyiciler daha çok podosit hasarını, hastalığın yaygınlığı ve şiddetini yansıtır olsa da birbiri ile ilişkili ya da benzer boyanma paterni gösteren bu belirleyiciler patogenezi aydınlatmak ve ayırıcı tanıya destek olmak açısından önem taşımaktadır.

SUMMARY

After the identification of the role of podocyte related molecules in glomerular filtration barrier and the detection of nephrin gene mutation which causes heavy proteinuria in congenital nephrotic syndrome, the assessment of these proteins in acquired nephrotic syndrome cases have also come into question. In the present study we examined the expression and clinical relevance of 'slit diaphragm' proteins including nephrin, podocin and synaptopodin in cases of minimal change disease, focal segmental glomerulosclerosis and mesangial proliferation, in which podocyte damage is the common feature. 84 cases, 10 of which were controls were included in the study. We detected coarse granular staining with nephrin, podocin and synaptopodin in cases of focal segmental glomerulosclerosis, fine granular staining in cases of minimal change disease and both coarse and fine granular staining in cases characterized by mesangial proliferation, which was in between focal segmental glomerulosclerosis and minimal change disease. Podocin staining intensity and the loss of nephrin expression were correlated with creatinine clearance and blood creatinine levels. When the expression of TGF- β 1 in podocytes, which functions in extracellular matrix increase and apoptosis, was examined, cases of focal segmental glomerulosclerosis displayed a mild increase compared to other groups. There was a correlation between TGF expression and segmental sclerosis, global sclerosis, interstitial inflammation, fibrosis and tubular atrophy. Glomerular expression of WT-1 in cases of focal segmental glomerulosclerosis was mildly decreased compared to other groups, reflecting podocyte loss. We detected CD68 expression only in a few cases which did not express WT-1 and were in the stage of basal membrane separation and one of these cases was of cellular variant.

In conclusion, although afore mentioned markers rather reflect podocyte damage and extend and severity of the disease, they expressed a similar or related staining pattern and they are important to enlighten the pathogenesis and confirm diagnosis.

KAYNAKLAR

- 1 Akash N: Pathogenesis of focal and segmental glomerulosclerosis: a review. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 18: 226-230, 2007.
- 2 Akhtar M and Al Mana H: Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol* 11: 304-309, 2004.
- 3 Asanuma K and Mundel P: The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol* 7: 255-259, 2003.
- 4 Avila-Casado MC, Perez-Torres I, Auran A, Soto V, Fortoul TI, and Herrera-Acosta J: Proteinuria in rats induced by serum from patients with collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 66: 133-143, 2004.
- 5 Bariety J, Bruneval P, Hill G, Irinopoulou T, Mandet C, and Meyrier A: Posttransplantation relapse of FSGS is characterized by glomerular epithelial cell transdifferentiation. *J Am Soc Nephrol* 12: 261-274, 2001.
- 6 Barisoni L and Kopp JB: Update in podocyte biology: putting one's best foot forward. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12: 251-258, 2003.
- 7 Barisoni L, Kriz W, Mundel P, and 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* 10: 51-61, 1999.
- 8 Barisoni L and Mundel P: Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol* 23: 353-360, 2003.
- 9 Bernstein J, Jr. and Edelmann CM, Jr.: Minimal change nephrotic syndrome. Histopathology and steroid-responsiveness. *Arch Dis Child* 57: 816-817, 1982.
- 10 Besbas N, Topaloglu R, Saatci O, and Bakkaloglu A: Long-term follow-up in children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin Pediatr (Phila)* 31: 283-288, 1992.

- 11 Bottinger EP and Bitzer M: TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 2600-2610, 2002.
- 12 Camici M: The Nephrotic Syndrome is an immunoinflammatory disorder. *Med Hypotheses* 68: 900-905, 2007.
- 13 Chen CL, Fang HC, Chou KJ, Lee JC, Lee PT, Chung HM, and Wang JS: Increased endothelin 1 expression in adult-onset minimal change nephropathy with acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 45: 818-825, 2005.
- 14 Coward RJ, Foster RR, Patton D, Ni L, Lennon R, Bates DO, Harper SJ, Mathieson PW, and Saleem MA: Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes. *J Am Soc Nephrol* 16: 629-637, 2005.
- 15 D'Agati VD: Podocyte injury in focal segmental glomerulosclerosis: Lessons from animal models (a play in five acts). *Kidney Int* 73: 399-406, 2008.
- 16 D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, and Jennette JC: Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis* 43: 368-382, 2004.
- 17 D'Amico G and Bazzi C: Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int* 63: 809-825, 2003.
- 18 Daskalakis N and Winn MP: Focal and segmental glomerulosclerosis: varying biologic mechanisms underlie a final histopathologic end point. *Semin Nephrol* 26: 89-94, 2006.
- 19 Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K, and Camussi G: Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 158: 1723-1731, 2001.
- 20 Furness PN, Hall LL, Shaw JA, and Pringle JH: Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1234-1237, 1999.
- 21 Goumenos DS, Tsamandas AC, Kalliakmani P, Tsakas S, Sotsiou F, Bonikos DS, and Vlachojannis JG: Expression of apoptosis-related proteins bcl-2 and bax along

with transforming growth factor (TGF-beta1) in the kidney of patients with glomerulonephritides. *Ren Fail* 26: 361-367, 2004.

- 22 Griffin SV, Petermann AT, Durvasula RV, and Shankland SJ: Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. *Nephrol Dial Transplant* 18 Suppl 6: vi8-13, 2003.
- 23 Griffin SV, Petermann AT, Durvasula RV, and Shankland SJ: Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. *Nephrol Dial Transplant* 18 Suppl 6: vi8-13, 2003.
- 24 Griffin SV, Pichler R, Wada T, Vaughan M, Durvasula R, and Shankland SJ: The role of cell cycle proteins in Glomerular disease. *Semin Nephrol* 23: 569-582, 2003.
- 25 Habib R and Kleinknecht C: The primary nephrotic syndrome of childhood. Classification and clinicopathologic study of 406 cases. *Pathol Annu* 6: 417-474, 1971.
- 26 Holt RC, Webb NJ, Ralph S, Davies J, Short CD, and Brenchley PE: Heparanase activity is dysregulated in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int* 67: 122-129, 2005.
- 27 Holthofer H: Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis. *Nephrol Dial Transplant* 22: 2124-2128, 2007.
- 28 Holzman LB, St John PL, Kovari IA, Verma R, Holthofer H, and Abrahamson DR: Nephlin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* 56: 1481-1491, 1999.
- 29 Horinouchi I, Nakazato H, Kawano T, Iyama K, Furuse A, Arizono K, Machida J, Sakamoto T, Endo F, and Hattori S: In situ evaluation of podocin in normal and glomerular diseases. *Kidney Int* 64: 2092-2099, 2003.
- 30 Huang JJ, Hsu SC, Chen FF, Sung JM, Tseng CC, and Wang MC: Adult-onset minimal change disease among Taiwanese: clinical features, therapeutic response, and prognosis. *Am J Nephrol* 21: 28-34, 2001.
- 31 Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, and Benzing T: Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem* 276: 41543-41546, 2001.

- 32 Huh W, Kim DJ, Kim MK, Kim YG, Oh HY, Ruotsalainen V, and Tryggvason K: Expression of nephrin in acquired human glomerular disease. *Nephrol Dial Transplant* 17: 478-484, 2002.
- 33 Jalanko H: Pathogenesis of proteinuria: lessons learned from nephrin and podocin. *Pediatr Nephrol* 18: 487-491, 2003.
- 34 Jenette JC, Olson JL, Schwartz MM, and Silva FG: Pathology of the kidney. Lippincott Williams&Wilkins, 2007.
- 35 Kanai H, Mitsuhashi H, Ono K, Yano S, and Naruse T: Increased excretion of urinary transforming growth factor beta in patients with focal glomerular sclerosis. *Nephron* 66: 391-395, 1994.
- 36 Kemeny E, Durmuller U, Nickeleit V, Gudat F, and Mihatsch MJ: Distribution of podocyte protein (44 KD) in different types of glomerular diseases. *Virchows Arch* 431: 425-430, 1997.
- 37 Kim BK, Hong HK, Kim JH, and Lee HS: Differential expression of nephrin in acquired human proteinuric diseases. *Am J Kidney Dis* 40: 964-973, 2002.
- 38 Kim JH, Kim BK, Moon KC, Hong HK, and Lee HS: Activation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 64: 1715-1721, 2003.
- 39 Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, and Bruijn JA: Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 14: 2063-2071, 2003.
- 40 Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, and Jaenisch R: WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74: 679-691, 1993.
- 41 Kretzler M: Regulation of adhesive interaction between podocytes and glomerular basement membrane. *Microsc Res Tech* 57: 247-253, 2002.
- 42 Kriz W, Gretz N, and Lemley KV: Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 54: 687-697, 1998.

- 43 Lahdenkari AT, Kestila M, Holmberg C, Koskimies O, and Jalanko H: Nephrin gene (NPHS1) in patients with minimal change nephrotic syndrome (MCNS). *Kidney Int* 65: 1856-1863, 2004.
- 44 Lenkkeri U, Mannikko M, McCready P, Lamerdin J, Gribouval O, Niaudet PM, Antignac CK, Kashtan CE, Homberg C, Olsen A, Kestila M, and Tryggvason K: Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet* 64: 51-61, 1999.
- 45 Lichtig C, Ben Izhak O, On A, Levy J, and Allon U: Childhood minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis: a continuous spectrum of disease? Pathologic study of 33 cases with long-term follow-up. *Am J Nephrol* 11: 325-331, 1991.
- 46 Mathieson PW: Minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Immunopathol* 29: 415-426, 2007.
- 47 Mundel P and Shankland SJ: Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 13: 3005-3015, 2002.
- 48 Musante L, Candiano G, Zennaro C, Bruschi M, Carraro M, Artero M, and Ghiggeri GM: Humoral permeability factors in the nephrotic syndrome: a compendium and prospectus. *J Nephrol* 14 Suppl 4: S48-S50, 2001.
- 49 Nagata M, Shu Y, and Tomari S: Role of cell cycle molecules in the pathophysiology of glomerular epithelial cells. *Microsc Res Tech* 57: 203-207, 2002.
- 50 Nolasco F, Cameron JS, Heywood EF, Hicks J, Ogg C, and Williams DG: Adult-onset minimal change nephrotic syndrome: a long-term follow-up. *Kidney Int* 29: 1215-1223, 1986.
- 51 Ohashi R, Kitamura H, and Yamanaka N: Peritubular capillary injury during the progression of experimental glomerulonephritis in rats. *J Am Soc Nephrol* 11: 47-56, 2000.
- 52 Ohtaka A, Ootaka T, Sato H, and Ito S: Phenotypic change of glomerular podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis: developmental paradigm? *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 9: 11-15, 2002.

- 53 Ostalska-Nowicka D, Zachwieja J, Maciejewski J, Wozniak A, and Salwa-Urawska W: The prognostic value of glomerular immaturity in the nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol* 19: 633-637, 2004.
- 54 Patari-Sampo A, Ihalmio P, and Holthofer H: Molecular basis of the glomerular filtration: nephrin and the emerging protein complex at the podocyte slit diaphragm. *Ann Med* 38: 483-492, 2006.
- 55 Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, Holmberg C, Heikinheimo M, Tryggvason K, and Jalanko H: Expression of nephrin in pediatric kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 12: 289-296, 2001.
- 56 Patrakka J and Tryggvason K: Nephrin--a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med* 13: 396-403, 2007.
- 57 Pavenstadt H, Kriz W, and Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83: 253-307, 2003.
- 58 Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, and ten Dijke P: TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 24): 4557-4568, 1999.
- 59 Quaggin SE and Kreidberg JA: Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development* 135: 609-620, 2008.
- 60 Regele HM, Fillipovic E, Langer B, Poczewski H, Kraxberger I, Bittner RE, and Kerjaschki D: Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 11: 403-412, 2000.
- 61 Rennke HG: How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage? *Kidney Int Suppl* 45: S58-S63, 1994.
- 62 Savin VJ, McCarthy ET, and Sharma M: Permeability factors in focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol* 23: 147-160, 2003.
- 63 Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, and Bottinger EP: Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest* 108: 807-816, 2001.

- 64 Schmid H, Henger A, Cohen CD, Frach K, Grone HJ, Schlondorff D, and Kretzler M: Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. *J Am Soc Nephrol* 14: 2958-2966, 2003.
- 65 Schonholzer KW, Waldron M, and Magil AB: Intraglomerular foam cells and human focal glomerulosclerosis. *Nephron* 62: 130-136, 1992.
- 66 Schonholzer KW, Waldron M, and Magil AB: Intraglomerular foam cells and human focal glomerulosclerosis. *Nephron* 62: 130-136, 1992.
- 67 Schwartz MM and Korbet SM: Primary focal segmental glomerulosclerosis: pathology, histological variants, and pathogenesis. *Am J Kidney Dis* 22: 874-883, 1993.
- 68 Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, and Mundel P: Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 108: 1621-1629, 2001.
- 69 Seiler MW, Rennke HG, Venkatachalam MA, and Cotran RS: Pathogenesis of polycation-induced alterations ("fusion") of glomerular epithelium. *Lab Invest* 36: 48-61, 1977.
- 70 Siegel NJ, Gaudio KM, Krassner LS, McDonald BM, Anderson FP, and Kashgarian M: Steroid-dependent nephrotic syndrome in children: histopathology and relapses after cyclophosphamide treatment. *Kidney Int* 19: 454-459, 1981.
- 71 Siegel NJ, Goldberg B, Krassner LS, and Hayslett JP: Long-term follow-up of children with steroid-responsive nephrotic syndrome. *J Pediatr* 81: 251-258, 1972.
- 72 Smith SM, Hoy WE, and Cobb L: Low incidence of glomerulosclerosis in normal kidneys. *Arch Pathol Lab Med* 113: 1253-1255, 1989.
- 73 Srivastava T, Garola RE, Whiting JM, and Alon US: Synaptopodin expression in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int* 59: 118-125, 2001.
- 74 Srivastava T, Whiting JM, Garola RE, Dasouki MJ, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Hamed R, and Alon US: Podocyte proteins in Galloway-Mowat syndrome. *Pediatr Nephrol* 16: 1022-1029, 2001.

- 75 Strehlau J, Schachter AD, Pavlakis M, Singh A, Tejani A, and Strom TB: Activated intrarenal transcription of CTL-effectors and TGF-beta1 in children with focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 61: 90-95, 2002.
- 76 Takahashi-Iwanaga H: Comparative anatomy of the podocyte: A scanning electron microscopic study. *Microsc Res Tech* 57: 196-202, 2002.
- 77 Tryggvason K: Nephrin: role in normal kidney and in disease. *Adv Nephrol Necker Hosp* 31: 221-234, 2001.
- 78 Tryggvason K, Patrakka J, and Wartiovaara J: Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 354: 1387-1401, 2006.
- 79 Tryggvason K, Ruotsalainen V, and Wartiovaara J: Discovery of the congenital nephrotic syndrome gene discloses the structure of the mysterious molecular sieve of the kidney. *Int J Dev Biol* 43: 445-451, 1999.
- 80 Tryggvason K and Wartiovaara J: Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10: 543-549, 2001.
- 81 Wernerson A, Duner F, Pettersson E, Widholm SM, Berg U, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Hultenby K, and Soderberg M: Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 18: 70-76, 2003.
- 82 Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, and Border WA: Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 49: 461-469, 1996.
- 83 Yang Y, Gubler MC, and Beauvils H: Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy. *Nephron* 91: 416-423, 2002.
- 84 Zimmerman SW: Increased urinary protein excretion in the rat produced by serum from a patient with recurrent focal glomerular sclerosis after renal transplantation. *Clin Nephrol* 22: 32-38, 1984.