



T.C.

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

HAFSA SULTAN HASTANESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

PÜROMİSİN (PAN) İLE NEFROTİK SENDROM GELİŞTİRİLEN
RATLARDA $1,25(\text{OH})_2$ VİTAMİN D₃ VE PARİKALSİTOLÜN PROTEİNÜRİ
İLE PODOSİN VE NEFRİN MRNA ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hamdi METİN

Tez Danışmanı:

Prof.Dr. Pelin ERTAN

MANİSA-2016

ÖNSÖZ

Tezimin tüm aşamalarında emeği ve bilgisinden yararlandığım, bana yol gösteren ve desteğini her zaman hissettiren tez hocam Sayın Prof. Dr. Pelin ERTAN'a;

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyiminden yararlandığım, destek ve yardımını gördüğüm başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Muzaffer POLAT olmak üzere tüm hocalarıma;

Tezimde yer alan histolojik parametrelerin çalışılmasında ve hayvan deneyi süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER ve ekibine;

Tezimde yer alan genetik parametrelerin çalışılmasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof.Dr. Sırrı ÇAM ve ekibine;

Tezimde yer alan verilerin istatistiksel analizinde ve yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Pembe KESKİNOĞLU'na;

Birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım, tezimin hazırlanma sürecinde de yanımda olan sevgili uzmanlarıma, asistan ve hemşire arkadaşlarıma;

Her zaman olduğu gibi sabır ve desteklerini esirgemeyen, hayatımızı her şekilde kolaylaştırmaya çalışıp bana çalışma ortamı sunan aileme;

Bu uzun süren çalışmada sonsuz hoşgörüsü, sabrı ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan biricik eşim Damla METİN'e;

Ve tez sürecimde ailemize katılmış olan beni motive eden kızım Duru METİN'e;

TEŞEKKÜR EDER ve SAYGILARIMI SUNARIM...

Dr. Hamdi METİN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
ŞEKİL VE GRAFİKLER	vi
TABLolar	vii
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek Anatomisi	3
2.2. Böbrek Histolojisi	4
2.3. Böbrek Fizyolojisi	6
2.4. Nefrotik Sendrom	8
2.4.1. Sınıflandırma	9
2.4.1.1. Klinik Sınıflandırma	9
2.4.1.2. Histopatolojik Sınıflandırma	9
2.4.1.2.1. Minimal Lezyon Hastalığı	10
2.4.1.2.2. Fokal Segmental Glomerüloskleroz	10
2.4.1.2.3. Mezangial Proliferatif Glomerülonefrit	10
2.4.1.2.4. Membranoproliferatif Glomerülonefrit	10
2.4.1.2.5. Membranöz Glomerülonefrit	10
2.4.1.3. Tedaviye Cevaba Göre Sınıflandırma	11
2.4.2. Nefrotik Sendrom Fizyopatolojisi	11
2.4.2.1. Proteinüri	11
2.4.2.2. Hipoalbuminemi	12
2.4.2.3. Ödem	12
2.4.2.4. Hiperlipidemi	12
2.4.3. Genetik	13
2.4.4. İmmünolojik Bozukluklar	14
2.4.5. Klinik	14
2.4.6. Tanı	15
2.4.7. Laboratuvar Bulguları	15
2.4.8. Nefrotik Sendrom Tedavisi.	15
2.4.8.1. Spesifik Tedavi	15
2.4.8.1.1. Kortikosteroidler	15
2.4.8.1.2. Sitotoksik Tedaviler	16
2.4.8.2. Destek Tedavi	17
2.5. Deneysel Nefrotik Sendrom Geliştirme	17
2.5.1. Püromisin Aminonükleozid Nefriti	17
2.5.2. Adriamisin (Doxarubicin) İle Oluşturulan Nefrotik Sendrom	18
2.5.3. Heymann Nefriti	18
2.6. D Vitamini Metabolizması	18
2.6.1. D Vitamini Reseptörleri	20

III.MATERYAL VE METOD	22
3.1. Deneysel Çalışma	22
3.2. Deney Hayvaları	22
3.3. Method	23
3.4. İstatistiksel Analizi	29
IV.BULGULAR	31
V.TARTIŞMA	42
5.1. Şıçan Seçim Ve Bakımı	42
5.2. Deneysel Nefrotik Sendrom Modeli	42
5.3.Proteinüri Etkisi	43
5.4.D Vitamini Ve Parikalsitol Etkisi	44
VI. SONUÇLAR	47
VII. ÖZET	52
VIII. ABSTRACT	54
IX.KAYNAKLAR	56

KISALTMA

GFR.	: Glomerüler filtrasyon hızı
HT.	: Hipertansiyon
DM.	: Diyabetes Mellitus
ADH.	: Antidiüretik Hormon
ANP.	: Atrial Natriüretik Peptit
MLH.	: Minimal Lezyon Hastalığı
FSGS.	: Fokal Segmental Glomerüloskleroz
MPGN.	: Membranoproliferatif Glomerülonefrit
APSGN.	: Akut Poststreptokoksik Glomerülonefrit
MGN.	: Membranöz Glomerülonefrit
SLE.	: Sistemik Lupus Eritematozus
SRNS.	: Steroid Rezistans Nefrotik Sendrom
BUN.	: Kan üre azotu
ACE.	: Anjiotensin Konverting Enzim
PAN.	: Püromisin Aminonükleozid Nefriti
VDR.	: Vitamin D Reseptörü
ARB.	: Anjiotensin reseptör blokörü
KBY.	: Kronik böbrek yetmezliği
NSAI.	: Nonsteroid antienflamtuvar
PAN.	: Püromisin aminonükleozid nefriti
GLM.	: Genelleştirilmiş doğrusal model

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER

Şekil 1. Nefrotik Sendrom İle İlişkili İmmünolojik Faktörler	14
Şekil 2. D Vitamini Metabolizması	20
Şekil 3. Gruplara göre 0. Gün protein/kreatinin oranının dağılımı	34
Şekil 4. Gruplara göre 4. Gün protein/kreatinin oranının dağılımı	36
Şekil 5. Gruplara göre nefrin ve podosin mRNA ekspresyon farkı	37
Şekil 6. Kontrol, Nefrotik Sendrom, D vitamini ve Parikalsitol gruplarına ait histolojik kesitlerin Hematoksilen-Eozin ile boyalı örnekleri	39
Şekil 7. Kontrol, Nefrotik Sendrom, D vitamini ve Parikalsitol gruplarına ait kesitlerde nefrin ve podosin primer antikorlarının immunohistokimyasal dağılımları.	40

TABLO

Tablo 1. Nefrotik Sendrom Klinik Sınıflandırması	9
Tablo 2. Nefrotik Sendrom Histopatolojik Sınıflandırması	11
Tablo 3. Proteinüri Tanımı	12
Tablo 4. Nefrotik Sendrom İlişkili Genetik Mutasyonlar	13
Tablo 5. Deneysel Nefrotik Sendrom Modelleri	18
Tablo 6. Çalışma Grupları	23
Tablo 7. Parafin Takip Protokolü	25
Tablo 8. Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü	26
Tablo 9. Glm Modellemesi	30
Tablo 10. Kontrol Grubu Proteinürisi	32
Tablo 11. Nefrotik Sendrom Grubu Proteinürisi	32
Tablo 12. D Vitamini Grubu Proteinürisi	33
Tablo 13. Parikalsitol Grubu Proteinürisi	33
Tablo 14. 0. Gün Grupların Protein/Kreatinin Oranı Karşılaştırması	34
Tablo 15. 4. Gün Grupların Protein/Kreatinin Oranı Karşılaştırması	35
Tablo 16. 7. Gün Grupların Protein/Kreatinin Oranı Karşılaştırması	36
Tablo 17. Nefrin mRNA Ekspresyon Farkı Median Değerleri	37
Tablo 18. Nefrin mRNA Ekspresyon Farkı Median Değerleri Ve Posthoc Analizi	38
Tablo 19. Podosin İmmünohistokimyasal Dağılımı	41
Tablo 20. Nefrin İmmünohistokimyasal Dağılımı	41

I.GİRİŞ VE AMAÇ

Proteinüri, kronik böbrek yetmezliğinin ilerlemesinde ana prediktördür ve aynı zamanda biyokimyasal belirteç olarak da yer alır.(115,116) Proteinüri kronik böbrek yetmezliği yönetiminde ilk ulaşılması gereken tedavi hedefi olarak farkedilmiştir.(117-118)ARB 'ler ilk tedavi önerisi olarak kullanılır. Fakat rezidü proteinüri devam etmektedir. Başka tedavi önerileri de olmuştur. Bunlardan biri olan D vitamini ve derivasyonlarıdır ve orta düzeyde multipl etkisi vardır. Gen ve böbrek üstünde multisistemik etki (kardiovasküler sistem, immun sistem) yarattığı gösterilmiştir. Bunlardan biri antiproteinürik etkisidir ve birçok çalışma bu etkiyi desteklemektedir.(119-120) Fakat bu etki klinik olarak gösterilememiştir.

Nefrotik sendrom, nefrotik tipte proteinüri ve idrarla büyük miktarda protein kaybıyla ilişkili klinik bulgu triadı ile tanımlanır. Bu triad da hipoalbümin, hiperlipidemi ve ödem yer alır. Nefrotik tipte proteinüri $>40\text{mg}/\text{m}^2/\text{saat}$ veya sabah ilk idrarda protein: kreatinin oranının $>2-3:1$ olarak tanımlanır. Nefrotik sendromun altında yatan anormallik, masif proteinüri ve hipoalbüminemiye yol açan glomerüler kapiller duvarın geçirgenliğinin artmasıdır.(30) Biyopside görülen podosit ayak proseslerin silinmesi podositin başlıca rolü olduğunu düşündürür.

Renin anjiotensin aldosteron sistemini bloke eden ilaçlar proteinüriyi azaltma ve hastalığın ilerleyişini yavaşlatmada etkilidir. Diyet ve hijyen önerilerine uyulması sonrasında; anjiotensin reseptör blokörleri (ARB) renoprotektif ve antiproteinürik tedavinin ilk adımıdır. Seviye 1 öneri olarak yer alır.(121-124) Ancak ARB'lerin antiproteinürik etkisi genellikle suboptimaldir ve tedavi için hedefe ulaşılsa bile (renoprotektif etki sağlanmış olsa) hastanın rezidüel proteinürisi devam eder. ARB'ler rezidüel proteinüriyi azaltmasına rağmen çift blok potansiyeli nedeniyle ters etki yaratabilirler. Bu durum mortaliteyi azaltmaz ve diyabet gibi yaygın nefropati olan hastalarda böbrek fonksiyonlarında belirgin bir gelişme sağlayamaz.(121-126)

Klinik olarak birçok ilaç rezidüel proteinürinin azaltılması için test edilmiştir. Bunlardan biri olan D vitamini ve derivasyonlarının orta düzeyde multipl etkisi vardır. D Vitamini karaciğerde sentezlenmeye başlar ve böbrekte değişime uğrar.(30) İntraselüller D vitamini reseptörü, VDR olarak tanımlanır ve bu reseptör kalsitriol aktivatorüdür. Bu doğal üretiminde parikalsitol gibi selektif VDRA'leri vardır.

Kültürde üretilen podositlerde, kalsitriolün doza bağımlı bir şekilde nefrin genin transkripsiyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. Kültürlenmiş böbrek hücrelerinde ise kalsitriol ve parikalsitol hem podositler hem de boru şeklindeki hücrelerinde interlökin (IL) -6, monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1), IL-8 ,yüksek glukoz konsantrasyonları gibi enflamasyon araçlarının yanıtının ekspresyonunu azaltmıştır.(129)

Yapılan çalışmalarda, deneysel nefropatilerin üzerinde VDRA'nın olası antiproteinürik etkisi ele alınmıştır. VDRA farklı hayvan modellerinde antiproteinürik etkiye sahiptir. VDR aktivasyonu, bağışıklık kökenli nefropatinin, subtotal nefrektomi KBY'nin, diyabetik nefropatinin, püromisinle oluşturulmuş nefrotik sendromun ve glomerüler nefropatilerinin üzerinde antiproteinürik etkisi olabileceğine dair kanıtlar vardır.VDRA farklı hayvan modellerinde antiproteinürik etkiye sahiptir. Fakat kalsitriol ve 1,25(OH)2D3 kullanılmasına rağmen parikalsitole karşılaştırma çalışmalarına rastlamadık. İnsan çalışmaları yapılmadan önce parikalsitolün proteinüri ve böbrek dokusu üzerine olacak etkilerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle yapacağımız çalışmada sıçanlar üzerinde etkin olduğu ortaya çıkar ise normalde farkı amaçlarla tedavi olarak kullanılan parikalsitolün proteinürinin azaltılması ve renal koruyucuk açısından insan çalışmalarında kullanılmasına katkıda bulunacaktır.

II.GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Anatomisi

Böbrekler, çift organ olup karın boşluğunun üst ve arka tarafında retroperitoneal aralıkta columna vertebralisin iki yanında T12-L3 seviyesinde yer alır. (1) Erişkin böbrek uzunluğu 10 cm, genişliği 5 cm, kalınlığı 2.5cm'dir. Sol böbrek, sağ böbreğe göre biraz daha uzun ve dardır. Ağırlık erişkin erkekte 125-170gr, kadında ise 115-155gr'dır(1,2).

Facies anterior ve facies posterior olmak üzere iki yüzü vardır. Margo medialis ve margo lateralis olarak iki kenarı vardır. Böbrek dışı doğru capsula fibrosa, capsula adiposa, fascia renalis olarak 3 kılıfla sarılmıştır. Böbrek korteks renalis , medulla renalis ve sinüs renalisten oluşur. (1) Medulla renalis sayıları 8-10 arasında değişen , pyramis renalis denilen koni şeklindeki yapılardan oluşur. Bu piramitlerin basis pyramidis denilen taban kısmı böbreğin dış kısmına , papilla renalis denilen tepe kısmı ise sinüs renalise bakar. Pyramis renalislerin arasına columna renalis denilen kortikal cevher uzantıları girmiştir. Bir pyramis renalis papilla renalis hariç tamamen korteks renalis ile çevrelenmiştir. Pyramis renalis ve çevresini saran kortikal kısma beraber lobus renalis denir. Pyramis renalislerin taban kısımlarından kortikal cevhere doğru uzanan ve medullar cevhere ait olan ışınal yapılara pars radiata denir.(1,2) Kortikal cevherin pyramis renalisler tarafından kalan bölümüne columna renalis denir.(1)

Malpighi cisimciği, arteriola glomerularis afferens ve efferensin oluşturduğu damar yumağına glomerulus ve bunu saran yapıya Bowman Kapsülü denir. Her Malpighi cisimciği ve buna ait idrar kanalcığı, kandan idrar süzen bir birim oluşturur. Nefron denilen bu birimler her bir böbrekte yaklaşık 1.000.000-1.250.000 adet arasındadır. Her bir nefron kısa bir ara parça ile toplayıcı kanallara açılır. Toplayıcı kanallar birleşerek daha kalın toplayıcı kanalları oluşturur. Sonunda papilla renaliste bulunan sayıları 10-25 arasında değişen ve foramina papillare veya pori uriniferi denilen deliklerle kaliks renalis minora açılır. Toplayıcı kanallar böbreğin medullar cevherinde bulunur.(1) 1-3 papilla renalis bir kaliks minör' e açılır. 2-3 kaliks minör bir kaliks majörü oluşturur.

Sayıları genelde 3 olan kaliks majörler pelvis renalis yapar. Pelvis renalis böbrek çıkışında daralarak üreteri oluşturur.(1,2)

2.2.Böbrek Histolojisi

En dışta ince kollajen ipliklerden zengin sağlam fibröz bir kapsülle çevrilidir. Kapsülde az sayıda elastik iplikler vardır.(4) Kapsül iki tabaka gösterir. Dış tabaka fibroblastlar ve kollajen lif barındıran fibröz yapılardır. İçte ise çok sayıda myofibroblastlar vardır. Myofibroblastların kontraktilitesi olması nedeniyle böbreğin süzme özelliğine yardımcı olur. (5,6)

Renal lob, bir renal piramid ve onun devamı olan korteks bölümünden oluşur. Böbrek lob sayısı piramid sayısına denktir. Korteks kısmında çok sayıda nefron; medulla kısmında çok sayıda toplayıcı kanal bulunur.(9)

Her bir böbrek lobu birçok böbrek lobçuğuna ayrılır. Her renal lobta piramid tabanından çıkıp kortekse doğru ışınal uzanan birçok medulla radius vardır. Bu medulla radiuslar henle kulbunun başlangıç ve son kısmı ile toplayıcı kanalların başlangıç kısımları ve küçük kan damarlarını içerir. Renal lobçuğun eksenini medulla radiuslar oluşturur.(10)

Korteks bölümünde iki tip intertisyel hücre bulunur. Fibroblastlar ve makrofajlardır. Medullada ise myofibroblastlar ve diğer bağ doku hücreleri vardır. Proteoglikanlar ve ince kollajen lifler vardır. Myofibroblastların uzun eksenleri toplayıcı tüplere paralel olarak uzanır. Medulladaki bağ doku hücreleri komşu tüpcüklerin ve kan damarlarının etrafını saran sitoplazmik uzantılarla oluşur. Stromanın barındırdığı yapılar nefron ve toplayıcı kanallardır.(4,10)

Nefron; böbrek paraneşiminin fonsiyonel ve yapısal birimidir. Nefronlar birbirleri ile anastomoz yapmazlar. Nefronun başlangıcı olan böbrek cisimcikleri (malpigi cisimcikleri) balon gibi şişkindir. Bu kısım glomerül ve bowman kapsülü olarak iki kısımdan oluşur. Glomerüle giren ve çıkan arterlerin bulunduğu kısma damar kutbu tam karşısında süzülen sıvının çıktığı kısma idrar kutbu denir.(5,8)

Glomerül, arter hattından gelen yüksek basınçlı kanı olan pencerele kapilları ağıdır. A. Afferent renal cisimciğı girdikten sonra 2-5 adet primer dala ayrılır ve glomerül oluşur. Glomerülün çapı 200-250 mikronmetre kadardır. Sonrasında glomerül tekrar arteriole (a.efferent) dönüşür. Glomerülün kapilları pencerelelidir. Bu pencerelere por denir ve porlar diyafram ile kapatılmamıştır. Bu tek katlı yassı kapilları endotelleri bir bazal membran üzerine oturmuştur. Böylece kılcal damarların lümenindeki sıvı yüksek hidrostatik basıncının etkisi ile kolay filtrasyon gerçekleşir.(6,7) Bowman kapsülü, iki yaprak şeklindedir ve her yaprakta epitel hücrelerinden ibarettir. Tek katlı yassı epitelden oluşan dış yaprak ve tek katlı kübik epitelden oluşan iç yaprak arasında sıvının biriktiğı Bowman Aralığı mevcuttur.(9)

Viseral yaprak epitellerinde damar endotellerine doğru uzanan sekonder uzantılar vardır. Bunlara podosit denir. Podositlerin sitoplazmasında mikrotubuluslar ve mikroflamanlar vardır. Süzülen sıvı mikrotubuluslar ya da podositlerin arasında açıklıklardan süzölür.(6,9)

Böbrek cisimciğinin süzücü membranı endotel hücresi, podosit ve aralarındaki bazal membrandan oluşur. Bu membranın bulunduğı alanda üçüncü bir hücre türü bulunmaktadır. Bunlara mezangial hücreler denir. Kapilları yumak etrafında bulunanlara intraglomeruler mezangial hücre; damar kutbunda olanlara ekstraglomerüler mezangial hücre denir.(7)

Süzücü membranda tek devamlı yapı bazal membrandır. Bazal membran yaklaşık 0.1mikron kalınlığındadır. Elektron mikroskop ile bakıldığında elektron yoğun tabaka lamina densa ve her iki yanda elektron geçirgen tabaka lamina rara görölür.(11) Lamina densa tip4 kollajen, lamina rara da ise heparan sülfat yoğundur. Her ikisinde de fibronektin ve laminin bulunur.

Tubulus proksimalis, pasif ve aktif transport ile geri emilimin sağlandığı nefron bölümüdür. İdrar kutbundan bowman kapsülünün pariyetal yapraklarının devamı şeklinde başlar. Nefronun en uzun ve geniş bölümüdür. Geri emilimin büyük kısmını sağlar. İnce membran üstünde olan tek katlı kübik membranlar veya piramidal hücreler ile döşenmiştir. Çok sayıda mikrovillüs fırçamsı kenar vardır ve varolan mitokondrilerden dolayı asidofilik boyanır. Su,

glikoz, küçük proteinler vitamin C ve bazı iyonlar emilir. Geri emilen materyal peritübüler kapillerlere geçer.(10,11)

Medullaya yakın olan jukstamedullar nefronların henle kulbu uzun, kortikal nefronların ise kısadır. İki bölge arasında kalan nefronların henle kulbu orta uzunluktadır. İnen ve çıkan olmak üzere iki kulbu vardır. Reabsorbsiyon yeteneği bulunmaktadır. İdrarı hipertonikleştirir ve vücut suyunun korunmasını sağlar. İnen kol proksimal tubulün birden bire daralması ile oluşur ve medullada bulunur. Tek katlı yassı epiteldir. Çıkan kol düz parçadır ve medullaya uzanır. Tek katlı yassı epitel tek katlı kübik epitele dönüşür. Tuzlar ve üre Emilimi çıkan kolda gerçekleşir. Medullada giderek doku sıvısının onkotik basıncı artar. Çıkan kolonda aktif transport belirgin olup mitokondri ve ATP miktarı fazladır. (7,8)

Tubulus distalis, çıkan henle' nin devamı düz parça ve ondan sonraki kıvrımlı parçadan oluşur. Proksimal tübülden kısa olduğundan kesitlerde az görülür. Epiteli kısa ve kübiktir. Az sayıda mikrovillus vardır. Proksimal tübüle göre daha az reabsorbsiyon yapar. Ayrıca jukstaglomerüler aygıtın oluşmasına katkıda bulunur.(5,6)

Jukstaglomerüler aygıt, tubulus distalis böbrek cisimciğinin damar kutbunda ait olduğu nefronun a.affentiasına doğru ilerler ve temas eder. Temas noktasında meydana gelen değişiklikler sonucunda oluşur. Üç yapıdan oluşur. Jukstaglomerüler hücreler, A.afferensin glomerüle girişinde medial tabakadaki birkaç sıra epiteldir. Görevleri tam olarak bilinmemektedir.İdrarla temas halindedir ve idrar özelliğini diğer hücelere bildirir(4,7).

2.3. Böbrek Fizyolojisi

Böbreğin esas amacı vücudun ihtiyacı olmayan metabolizma ürünlerinin, ilaçların ve dışardan alınan yabancı maddelerin idrarla uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi ile vücut sıvılarının osmolaritesi korunur, asit sekresyonlarının kontrolü ve vücut tamponlarının stoklanması görev alır, ayrıca uzun süreli arteryel kan basıncı düzenlenmesine su ve sodyum atılımı ile katkıda bulunurken, kısa süreli arter kan basıncının düzenlenmesinde anjiotensin II faktörlerin yapımına neden olan

renin üzerinden etkir. Renin, prostoglandin, kininler ve eritropoetin salgıların ayrıca D vitamininin aktifleşmesinde rol oynar. Glikoneogenezde uzun süreli açlıkta aminoasit, laktat, pürüvat, gliserol ve ketoasitlerin öncüllerinden glukoz sentezler. Salgıladığı eritropoetinle eritrosit yapımını uyarır. Glomerül; afferent arteriollerden kan alan kapiller yumağa denir. Glomerüler kapiller endotel hücrelerinde suyun epitel hücresinden hızlı sıvı geçişini sağlayan akuaporin-1 su kanalları bulunur.

Glomerüler filtrasyonu belirleyen iki faktör vardır. Birincisi filtrasyon membranının geçirgenliğidir. Filtrasyon katsayısı(Kf) olarak tanımlanır. İkincisi ise kapiller membrana etki eden net filtrasyon basıncıdır. Glomerüler filtrasyon hızı(GFR)=Kf xNet filtrasyon basıncıdır. Filtrasyon membranındaki porların çapları 70-100000 dalton kadar olduklarından molekül ağırlığı küçük su, üre, sodyum gibi moleküller rahat geçebilirken molekül ağırlığı büyük olan proteinler geçememektedir. Membran negatif yüklü olduğundan katyonik moleküllerin geçişi engellenmektedir. (12,13).Net filtrasyon basıncı; filtrasyon basıncı, filtrasyon membranına etki eden filtrasyon kolaylaştıran veya engelleyen kolloid osmotik ve hidrostatik basınçların toplamıdır.

Otoregölasyon, arteryel kan basıncında belirgin değışikliklere karşın böbrek kan akımını ve GFR' nin sabit tutulmasına çalışan sistemik etkilerden bağımsız mekanizmaya denmektedir. Kontrol mekanizması sayesinde kan basında 75-160 mmHg arasındaki değışimler sırasında GFR de sadece yüzde bir civarında değışiklik olur. Otoregölasyon makula densadaki sodyum klorür yoğunluğundaki değışiklikten alınan geri bildirim ile renal arteriollerdeki direncin değışmesi ile sağlanır. GFR' nin aşırı artması otoregölasyonla engellenir.(14).

Proksimal tübül; nefronlarda aktif enerjinin en çok kullanıldığı, iskemiye en duyarlı ve nefrotoksinlerden en çok etkilenen alandır. Bu tübüllerde ultrafiltrattaki su ve sodyumun büyük bir kısmı geri emilir. Na+K+ATPaz pompası işlevi ile uygun elektrokimyasal gradient oluşturularak çeşitli taşıyıcıların kullanıldığı bu pasif difüzyon işlemine enerji kullanımı olmasından dolayı ikincil aktif transport adı verilmiştir.. Filtre edilen glukoz, fosfat,

aminoasitler ve diğ er organik sol  tlerin hemen tamamı sodyumla ilişkili olarak geri emilmektedir.(12,14)

Henle kulbu, ultrafiltratın %20-35' nin gerçekleştiği alandır. İnen ince kol suya geçirgendir. Suyun %20' si buradan geri emilir ve ultrafiltrat hipertonic hale gelir.  ıkan ince kolda Nacl emilir ve üre salgılanır.  ıkan kalın kol filtre edilen Sodyum +K+ Cl' un aktif olarak emildiği ve metabolik olarak en aktif kısımdır. (13)

Distal tübül, ilk kısmı tübüloglomerüler geri bildirimin düzenlenmesini sağlayan jukstaglomerüler aparatın bir parçası olan makula densayı oluştururken bundan sonraki kısım ise yapı olarak henle kulbunun çıkan kalın koluna benzemektedir. Bu bölüm NaCl konsantrasyonunu anlayan kemoreseptör içeren makula densayı içerir. (13,14)

Toplayıcı kanallar, idrar konsantrasyonunun ve asiditesinin şekillendiği son alandır. Kortikal toplayıcı kanallarda esas ve interkale hücreler olmak üzere iki hücre grubu vardır. Esas hücreler sodyum ve su reabsorbsiyonu, potasyum atılımını sağlar. İnterkale hücreler sayesinde hidrojen atılır ve bikarbonat reabsorbe edilir. Bu bölümdeki rabsorbsiyon ve atılımdan aldosteron sorumludur. Medullada su ve sodyum reabsorbsiyonun gerçekleştiği kısımdır. Bu alanda ADH etkilidir. Tübüler reabsorbsiyon sinirsel hormonal ve bölgesel mekanizmalar tarafından kontrol edilir. (14)

2.4.Nefrotik Sendrom

Nefrotik sendrom,glomerüler filtrasyon bariyerinde geçirgenliğin artması sonucu oluşan masif proteinüri ve sonucunda oluşan hipoproteinemi, ödem ve hiperlipidemi ile oluşan klinik durumdur(15,16). Çocuklarda masif proteinüri; 40 mg/m2/saat ve üzerinde proteinüri; sabah ilk idrarda protein/kreatinin oranının 2' nin üzerinde olması olarak tanımlanır. Hipoalbüminemi ise plazma albümin seviyesinin 2.5gr/dl' nin altında olmasıdır.(17) Nefrotik sendromun çocuklardaki yıllık insidansı 100.000 de 2-7dir.(18)  ocukluk  ağı nefrotik sendromlarının 2/3'   5 yaşından önce başlar ve % 80-85' ini minimal lezyon hastalığı oluşturur. (15,16,19)

2.4.1. Sınıflandırma

Nefrotik sendrom klinik görünüm, histopatolojik lezyon ve steroid tedavisine verdiği yanıtı göre sınıflandırılır.(16).

2.4.1.1. Klinik Sınıflandırma

Nefrotik sendrom oluşumuna göre primer ve sekonder nefrotik sendrom olarak iki gruba ayrılır.(20)

Primer nefrotik sendromun en sık karşılaşılan tipi minimal lezyon hastalığıdır. (15,18) Primer nefrotik sendrom idiopatik olarak da tanımlanabilir.

Sekonder nefrotik sendromlar sistemik hastalığa ikincil gelişirler.(16) Nefrotik sendromu biyokimyasal ve histopatolojik açıdan değerlendirmek amacıyla sıklıkla fare ya da sıçanlar için deneysel nefrotik sendrom oluşturulur.(21)

Tablo 1. Nefrotik sendrom klinik sınıflandırması

Primer Nefrotik Sendrom
1.İdiopatik Nefrotik Sendrom
a. Minimal Lezyon Hastalığı (MLH)
b. Fokal Segmental Glomerüloskleroz (FSGS)
c. Mezangial Proliferatif Glomerüloonefrit
2.İmmükompleks Glomerüloonefrit
a. Membranöz Glomerüloonefrit (MGN)
b. Membranoproliferatif Glomerüloonefrit(MPGN)
c. Akut Poststreptokoksik Glomerüloonefrit(APSGN)
3.Konjenital Nefrotik Sendrom
Sekonder Nefrotik Sendrom
1.Sistemik Hastalıklar: Henoch-Schönlein purpurası, sistemik lupus eritematozis (SLE), vaskülitler
2.Sistemik Enfeksiyonlar: Hepatit B, bakteriyel endokardit, sıtma, varisella, HIV, poststreptokoksik glomerulonefrit, İnfeksiyöz mononükleoz
3. Heredofamilyal hastalıklar: Diabetes mellitus, Alport Sendromu, Nail Patella sendromu
4. İlaçlar: Altın tuzları, Nonsteroid Antienflamatuvar İlaçlar (NSAID),
5. Neoplaziler: Hodgkin hastalığı, Lenfomalar, Lösemiler, Karsinomalar,
6. Diğerleri: Arı sokması, Aşılama, Tiroidit, Miksödem, Malign obezite

2.4.1.2. Histopatolojik Sınıflandırma

Işık mikroskopunda görülen glomerüler değişikliklere göre sınıflandırılmıştır.(22) Sonrasında immünfloresan ve elektron mikroskopi ile desteklenmiştir.

2.4.1.2.1. Minimal Lezyon Hastalığı

Minimal lezyon hastalığında glomerüllerde histolojik değişiklik olmadığı kabul edilir. Bazı hastalarda minimal mezangial kalınlaşma, bazal membranlarda kalınlaşma ve fokal mezangial hücre artışı görülebilir. İmmün depozit birikimi yoktur. Nadir de olsa mezangial depolanma olabilir. Bu depozitler IgM ve komplemanlardan oluşur. Podositlerde hipertrofi ve foot süreçlerinde genişleme olur.(15, 16, 22)

2.4.1.2.2. Fokal Segmental Glomerüloskleroz

Fokal segmental glomerüloskleroz glomerüllerin tamamen değil, bir kısmını tutan ve her glomerülün sadece segmentlerini etkileyen skleroz ile karakterizedir.(23)

2.4.1.2.3. Mezangial Proliferatif Glomerülonefrit

Mezangial hücrelerin sayısında belirgin artış, lökosit infiltrasyonu, kapiller obliterasyon ile birlikte mezangial matrikste skleroz görülür. Bowman kapsülünde kresent ve adhezyon vardır. İmmünlöresan mikroskopisi negatiftir. (16,25)

2.4.1.2.4. Membranoproliferatif Glomerülonefrit

Membranoproliferatif glomerülonefrit histolojik olarak glomerül hücrelerinde proliferasyon, mezangial alanda ve bazal membranda değişiklikler ile karakterizedir. (23) Üç histolojik alt tipi vardır. Tip I de lezyon subendotelial IgG ve kompleman birikmesi gözlenir. Tip II de intramembranöz dens depolanması ile bazal membran kalınlaşması gözlenir. Tip III de transmembranöz depolanma gözlenir. (25)

2.4.1.2.5. Membranöz Glomerülonefrit

Morfolojik olarak epitel altında glomerül kapiller duvar boyunca immünglobulin içeren birikimlerin varlığı ile karakterizedir.(23) Subendotelial depozitler düzenli bazen de düzensiz dağılım gösterir. (23,26)

Tablo2. Nefrotik Sendrom histopatolojik sınıflandırma

Glomerüler Lezyon Histopatolojisinin Sınıflandırması
1. Minimal Lezyon Hastalığı (MLH)
2. Fokal Glomerüloskleroz
a. Fokal Segmental Glomerüloskleroz (FSGS)
b. Fokal Global Glomerüloskleroz
3. Mezangial Proliferasyon
a. Diffüz Mezangial Proliferasyon
b. Sklerozan Glomerülonefrit
4. Membranoproliferatif Glomerülonefrit (MPGN)
a. Tip I MPGN: Subendotelyal Depolanma
b. Tip II MPGN: İntramembranöz Depozit
c. Tip III MPGN: Transmembranöz Depolanma
5. Membranöz Glomerülonefrit (MGN)
6. Kronik Glomerülonefrit

2.4.1.3. Tedaviye Cevabına Göre Sınıflandırma

Nefrotik Sendrom steroid tedavisine verdiği cevaba göre steroidde cevaplı ve steroidde dirençli olarak iki gruba ayrılır. (15) Steroide direnç düzenli olarak 6-8 hafta 60mg/m²/gün den alınmış prednisolon tedavisine rağmen masif proteinürinin devam etmesidir. (15,24) Başlangıçta steroidde cevap var iken izlemde cevapsızlaşan vakalar sekonder dirençli Nefrotik Sendrom olarak tanımlanır. Minimal lezyon hastalığı steroidde %85-90 yanıt vermektedir. Bu oran fokal segmental glomerülosklerozda %30 membranöz glomerülonefritte ise %5'e kadar azalmaktadır.(15,24,27) Steroide dirençli Nefrotik Sendromun idiopatik nefrotik sendromların %10' unu oluşturduğu bildirilmekle beraber bu oran son dönemde %27' ye çıkmıştır.(28,29)

2.4.2. Nefrotik Sendrom Fizyopatolojisi

Glomerüler kapiller duvar bozukluğu olup plazma proteinine karşı geçirgenliğin artması ile başlar. Hipoalbümineminin onkotik basıncıdaki azalma yaratması sonrasında ise ödem gelişir. Hipoalbümineminin karaciğerde sentezi tetiklemesi sonrasında lipoproteinlerin sentezide tetiklenir ve hiperlipidemi gelişir. (23)

2.4.2.1. Proteinür

Nefrotik tip proteinüri protein atılımının > 40 mg/m²/saat olması ya da sabah ilk idrarda protein: kreatinin oranının >2-3:1 olarak tanımlanmasıdır. (30,15) İdiopatik nefrotik sendromlarda bu podosit proses silinmesinin immün

sistemdeki komplekslerin bozukluğundan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. (30,31) Ayrıca var olan genetik mutasyonlar da bu duruma neden olabilirler. (podosin, aktinin 4, MYH9, NPHS2, WT1 vb.)(31)

Proteinürinin değerlendirilmesinde kalitatif, semikantitatif ve kantitatif değerlendirmeler vardır. (17) (tablo 3)

Tablo 3. Proteinüri tanımı

Proteinüri tanımları (14)	
1.Kalitatif	• Dansite 1015'in altında olan 3 idrar örneğinin 2sinde dipstik yönteminde + • Dansite 1015'in üzerinde olan idrar örneklerinde 2+ protein varlığı
2.Semikantitatif, sabah idrarında protein/kreatinin oranı (mg/mg)	• 0,2'in altı normal • 0,2-2,0 hafif • 2,0'in üzeri ağır proteinüri
3.Kantitatif	• Normal: 12-24 saatlik idrar örneğinde < 4mg/m2/h • Anormal : 12-24 saatlik idrar örneğinde 4-40mg/m2/h • Nefrotik sınır : 12-24 saatlik idrar örneğinde > 40mg/m2/h

2.4.2.2. Hipoalbüminemi

Masif proteinüri sonucunda oluşan hipoalbümineminin gelişmesi Nefrotik Sendromun değişmez bir sonucudur. (15,32) Hipoalbümineminin düzeyi kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Hipoalbüminemiye ikincil albümin globülin oranında tersine dönüş yaşanır. (30,48,49)

2.4.2.3.Ödem

Nefrotik sendromun ana klinik bulgusudur.(15,16) Ödem, hipoalbüminemi sonucunda plazma onkotik basıncı azalması, su ve iyonların interstisyel mesafeye geçmesi sonrasında oluşur.(15) Bu durumdan sonra intravasküler volümde azalma renal perfüzyon basıncını düşürür ve renin ajiotensin aldesteron zinciri aktifleşerek su tutulumu olur.(underfilling teorisi) (25,30) Sodyum tutulumunun intrarenal mekanizmalarla meydana gelmiş olabileceği de düşünülmektedir (overfilling teorisi).(17,25) Sodyum birikimi hipertansiyona yol açmaz fakat intertisyumda asimetric genişlemeye neden olur. (33)

2.4.2.4. Hiperlipidemi

Nefrotik Sendromda kolesterol, trigliserit, fosfolipid ve yağ asitlerinde plazmada artış görülür.(20) İki sebeple serum düzeylerinde artış görülür. Bunlardan birincisi hipoalbümineminin lipoprotein sentezi dahil olmak üzere

genel hepatik protein sentezini uyarmasıdır. Aynı zamanda bu durum koagülasyon faktörlerinin üretiminin artmasına neden olur. Bu da tromboz riskini artırır. Diğer sebep ise lipoprotein lipaz plazma düzeylerinde bu enzimin idrar ile kaybı nedeniyle azalma gözlenmesidir. Lipid katabolizmasında azalma görülür.(30,35) Serum albümin düzeyi ile kolesterol düzeyi arasında ters orantı mevcuttur. (32) Trigliserid düzeyleri değişkendir. Hafif hipoalbüminemi var ise normal sınırlarda olabilir.(34) Lipoproteinlerin sentez aşamaları ile albümin sentez aşamaları; çok yakın metabolik süreçler olduğundan albümin sentez artışı lipoprotein sentezini de arttırmaktadır. (32)

2.4.3. Genetik

Steroid dirençli nefrotik sendrom hastalarının bir kısmında slit diyaframı oluşturan podosin proteinlerinin ya da podosin iskeletinin (NPHS1, NPHS2, CD2AP, TRCP6 ve ACTN4) gen kodlarında değişiklikler mevcuttur. Nefrin slit diaframın anahatar moleküllerindendir.(143-145) Ayrıca steroide dirençli nefrotik sendrom hastaların bir kısmında glomerüler bazal membran (LLAMB2), mitokondriyal (COQ2) ya da normal transkripsiyon (WT1,LMX1B) genlerindeki mutasyonların varlığı gösterilmiştir.(36) Genetik mutasyonlar sporadik steroid dirençli nefrotik sendromların %10-20' sinde görülmektedir. Fakat ailesel nefrotik sendromlarda bu oran daha fazladır.(31)

Tablo 4. Nefrotik Sendrom İlişkili Genetik Mutasyonlar (31)

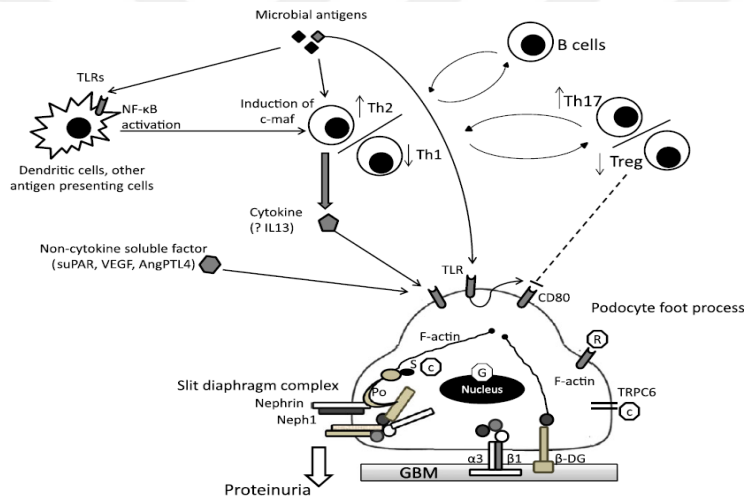
Gen	Lokus	Protein	Lokasyon	Kalıtım	Diğer
NPHS1	19q13.1	Nefrin	Slit diyafram	OR	Konjenital nefrotik sendrom
NPHS2	1q25-31	Podosin	Slit diyafram	OR	Konjenital nefrotik sendrom yada SRNS; FSGS
PLCE1/NPHS3	10q23	Fosfolipaz Cepsilon 1	intraseküler	OR	SRNS;DMS; FSGS
WT1	11p13	Wilms tümörü 1	intraseküler	OD	SRNS; Denys-Drash
LAMB2	3p21	Laminin-β2	Glomerüler bazal membran	OR	Pierson Sendromu, SRNS, DMS, FSGS
ACTN4	19q13	A-aktinin-4	intraseküler	OD	Yetişkin dönem SRNS ;FSGS
LMX1B	9q34.1	LIM-homedomain transkripsiyon faktör 1β	intraseküler	OD	Tırnak-patella Sendromu, SRNS

OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif

2.4.4. İmmünolojik Bozukluklar

Nefrotik Sendrom T hücre fonksiyon bozukluğu olarak nitelendirilir. Bu hücrelerden salınan sitokinler glomerülde artar ve plazma proteinlerinin permabilitesini artırır. Hipotez olarak; glomerülde immün depozit yokluğu; remisyona girmiş kızamık enfeksiyonu oluşması; Hodgkin lenfoma ile ilişkili; T hücre fonksiyonlarını inhibe eden ilaç kullanımı(kortikosteroid, siklosporin) varlığı kabul edilir.(37) Ayrıca nefrotik sendromlar da renal hücre apoptozu tetiklenmektedir.(135-142)

Son çalışmalarda mikrobiyal ürünlerin Toll like reseptör(TLR) leri tetikleyerek doğuştan podositler üzerine immün yanıt geliştirdiği görülmektedir. (38,39) (Şekil 1)



Şekil 1. Nefrotik sendrom ilişkili immünolojik faktörler

2.4.5. Klinik

Nefrotik sendromlu hastalarda ödem, anoreksiya, irritabilite, karın ağrısı ve ishal gibi semptomlar yer almaktadır.(15, 16, 30) Minimal Lezyon Hastalığı bulunan çocuklarda hızlı ve ilerleyen ödem mevcuttur. Ancak diğer membranoproliferatif glomerülonefrit gibi hastalıklarda ödem gelişimi yavaş olur. Çok ileri tablolarda asit, labial ve skrotal şişlik ve plevral efüzyon da görülür. Süre uzar ise ödem batında sınırlanır ve diğer bölgelerden kaybolur.(15, 16, 25) Albümin sentezinin artması sonrasında hepatomegali ve

asitin uzun süreli kalışı nedeniyle peritonit gelişebilir. Aşırı asit toraksa geçerek plevral efüzyona ilişkin solunum sıkıntısına neden olabilir.(22,25)

2.4.6. Tanı

Spot idrarda protein/kreatinin oranı 2' nin üstündedir. İdrarda protein atılımı 40mg/m²/saat'in üstündedir. Serum albümin düzeyi 2.5g/dl' in altındadır ve serum kolesterol ile trigliserid düzeyi yükselmiştir. Serum kompleman düzeyi normaldir. Eğer hasta Minimal Lezyon Hastalığı ise bu bulgular standart klinik tanı için yeterlidir. Fakat diğer tanılar için renal biyopsi gerekliliği vardır.(30)

2.4.7. Laboratuvar Bulguları

Nefrotik sendromlu hastalarda laboratuvar tetkikleri nefrotik sendrom teşhisi, şiddeti ve olası etyolojik etken açısından yapılmaktadır. Stik idrar tetkikinde proteinüri, hematüri, hiyelin silendirler ve yağ cisimcikleri görülür. Eritrosit, granüller, mumsu ve geniş silendirler Minimal Lezyon Hastalığı dışındaki glomerülonefritler açısından anlamlıdır.(20,22) spot idrar protein /kreatinin oranı normalde 0,2 olarak belirtilmişken nefrotik sendromda 2,0 olarak tanımlanır. Nefrotik sendrom hastalarında albüminin 2,5gr/dl'nin altında olması beklenir.(20,22) Nefrotik sendromda IgG azalırken IgM ve IgE seviyeleri artar. Ayrıca serum kolesterol ve trigliserid seviyesinde artış mevcuttur. (22)

2.4.8. Nefrotik Sendrom Tedavisi

Spesifik tedavinin yanında ayrıca destek tedavisi de tedavi prosedüründe yer almaktadır.(22)

2.4.8.1. Spesifik Tedavi

Kortikosteroid tedavisi nefrotik sendromlu çocuklarda remisyon sağlanması için ilk ilaçtır. Sitotoksik ilaçlar kortikosteroid tedavisine yanıt vermeyen hastalarda kullanılmaktadır.(15,16,22,25)

2.4.8.1.1. Kortikosteroidler

Nefrotik sendrom tedavisinin değişmezlerinden olan tedavi rejimidir. Tedavi rejiminde 60mg/m²/gün (2mg/kg/gün) prednizolon günde 3-4 eşit dozda başlanır. 4-6 haftalık tedavi süreci ardından 40mg/m²/günaşırı tek doz 4-6 hafta; daha sonrasında ise steroid azaltılarak kesilir. Bu günümüzde kabul

edilen protokoldür.(40,41,45) Relaps vakalarında proteinüri kaybolana kadar 60mg/m²/gün yükleme dozunun 3-4 eşit parçada verilmesi ardından 40mg/m²/günaşırı tek doz 4 hafta verilmesi sonrasında azaltılarak kesildiği tedavi rejimi uygulanır.(42,43,47) Pulse metilprednizolon tedavisinin, steroide yanıtı bazı hastalarda yararı olduğu görülmüştür.(17,44) Pulse dozları intravenöz olarak 20-30mg/kg olup bu dozlar genelde 4-6 defa ya da farklı protokollere göre daha uzun süreli verilebilir.(15,17)

2.4.8.1.2. Sitotoksik Tedavi

Nefrotik sendromda sitotoksik ilaç kullanımı uzun süreli steroid kullanımına ikincil yan etkileri azaltmak, sık relapsı azaltmak, uzun vadeli remisyon sağlamak, steroide yanıtı vakalarda tedavinin devamını sağlamak açısından kullanılır.(22,46)

Siklofosfamid: Alkilleyici bir ajandır. İmmünsupresif ve aynı zamanda sitotoksik bir ajandır. (22) 2-2.5mg/kg/gün dozuyla başlanıp 8-12 haftada biriken doz 168mg/kg'ı geçmeyecek şekilde tedavi düzenlenir. Remisyon süresi tedavi dozu ve süresine bağlıdır.(50) Yan etkilerinin daha az görülmesi ve oral tedavi ile etkinlik düzeyi aynı olması nedeniyle ayda bir kez intravenöz olarak 500mg/m²/doz pulse olarak uygulanmaya başlanmıştır. İlk altı ayda cevap yoksa tedavi kesilir, cevap varsa 2 ya da 3 ayda bir doz uygulamasına geçilir ve toplam tedavi süresi 12-24 aydır.(32,40) Hemorajik sistit ise sık görülen bir yan etkidir.

Klorambusil: Siklofosfamide benzer bir alkilleyici ajandır. Oral alımda emilim hızlıdır aynı zamanda karaciğerde hızlı metabolize olur. (51) 0,1-0,2 mg/kg/gün toplam dozda 7-10mg/kg'ı geçmeyecek şekilde 8-10 hafta süre ile verilmelidir.(52)

Azotioprin: Dokuda 6-merkaptopürine dönüşür. Karaciğerde metabolize edilir ve böbrekten atılır. Kemik iliği süpresyonuna bağlı lökopeni yapar. (17)

Siklosporin A: T- hücrelerinin baskılanması özelliğine sahip immünsüpresan ajandır. Dozu 5-7mg/kg/gün 6 ay süre ile sonrasında uzun süre 2mg/kg/gündür.(54)

Levamisol: T-hücre stimülasyon özelliğine sahip immünmodülatördür. Ayrıca antihelmintik bir ajandır. Önerilen doz 2mg/kg günde bir, tedavi süresi 1-18 ay olarak verilmiştir.(27,53)

Takrolimus: CD4 yardımcı hücreler üzerinden seçici inhibitör etkiye sahip, makrolid grubu bir antibiyotiktir. Nakil tedavisinde kullanılırken tedaviye yanıtız nefrotik sendromlarda da kullanılmaya başlanmıştır. Plazma düzeyi ölçülen ilaç plazma düzeyi 50-100mgr/L'de tutacak şekilde 0,1mg/kg/gün iki eşit dozda verilmesi önerilir. Nefrotoksisite yan etkisi daha azdır.(55,56)

Mikofenolat Mofetil: Nakil hastalarında kullanılan bir immünsupresandır. Lupus nefritinde etkili olduğu gösterilmiştir. Dirençli nefrotik sendrom tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. (57)

2.4.8.2. Destek Tedavi

Nefrotik sendromlu çocuklarda destek tedavi diyet, aktivite ve diüretik tedaviden oluşmaktadır.(15, 16, 20) Hasta çocukların diyetinde şiddetli ödem varsa tuz kısıtlaması yapılır. Sıvı alımı hastaya bırakılmalıdır. Protein alımının değiştirilmesine gerek yoktur.(25) Aktivite kısıtlamasının hastalığın prognoz ve progresyonunda etkisi yoktur.

Diüretik ilaç kullanımı hastalarda respiratuvar ve gastrointestinal semptomlar veren masif ödem durumunda, gözlerin kapandığı, aktivite kısıtlanmasına neden olan, striaların oluştuğu ve akut böbrek yetmezliğinin olduğu vakalarda kullanılmalıdır. (22,25)

2.5.Deneysel Nefrotik Sendrom Geliştirilmesi

Deneysel nefrotik sendrom patofizyolojisinin öğrenilmesi için deney hayvanlarına verilen ilaç ya da antijenler ile nefrotik sendrom oluşturulmasıdır.(Tablo 5)

2.5.1. Püromisin Aminonükleozid Nefriti

Püromisin aminonükleozid nefritinin(PAN) Minimal Lezyon Hastalığı benzeri hastalık oluşturduğu kabul edilmektedir.(60). Glomerülde gelişen değişiklikler

PAN'ın intraperitoneal verilmesinden 24 saat sonra erken dönem bulgularını ortaya çıkarır. Ayaksı çıkıntılarda düzleşme erken bulgudur. (61,62) Ayrıca yapılan çalışmalarda PAN uygulanması sonrasında nefrinin ciddi miktarda azaldığı gösterilmiştir. (63). PAN'ın podositlere spesifik toksisitesi mevcuttur.

2.5.2. Adriamisin(Doxorubicin) İle Oluşturulan Nefrotik Sendrom

Antineoplastik ajan olan adriamisin hafif derece renal yetmezlik ve nefrotik sendrom oluşturur.(66,67) Renal fonksiyonların kısmi korunmasına rağmen uzun süreli proteinüri ve 12-16 hafta FSGS tablosu devam eder.(68,69) Adriamisin proteinürinin başlamasından önce heparan sülfatın elektriksel yoğunluğunda ve glomerüler kapiller duvarda epitelyal membran sialik asitte hızlı ve ilerleyen azalma görülür.(64,65) Düşük proteinli diyet ve ACE inhibitörlerinin kullanımı glomerüler patalojinin ilerlemesini engellemektedir.(58,59,66)

2.5.3.Heymann Nefriti

İnsandaki membranöz glomerülonefritine benzer bulgular ortaya çıkaran otoimmün bir patalojidir.(67) Sıçan böbrek korteksinden hazırlanan ekstre ile aynı tür sıçanın immünize edilmesi sonucunda oluşur. İmmünizasyonu takip eden 6-8 hafta içinde proteinüri gelişir ve 6-8 hafta devam eder. (68)

Tablo 5. Deneysel nefrotik sendrom modelleri

Nefrotik Sendrom Modelleri	Yapılış Şekli	Süre
PAN	İntravenöz enjeksiyon ile püromisin	24 saat
Adriamisin ile	İntravenöz ya intraperitoneal adriamisin	12-16 hafta
Heymann nefriti	Sıçan böbrek doku ekstresi	6-8 hafta

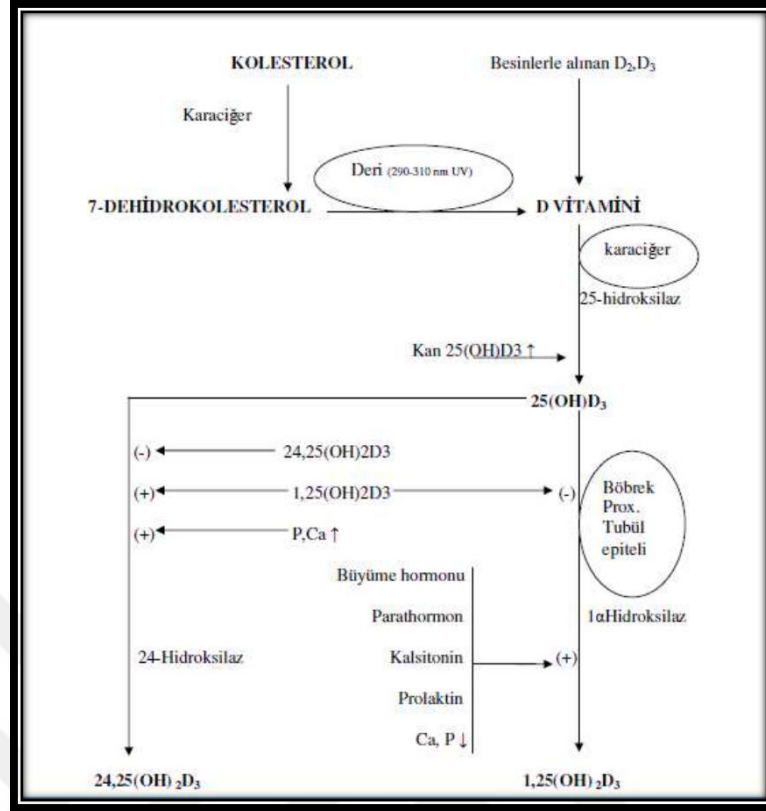
2.6.D Vitamini Kaynakları Ve Metabolizması

Kolekalsiferol 290-310nm dalga boyundaki ultraviyole ışınlarının etkisiyle deride hayvansal kaynaklı olan 7-dehidroksikolesterolden yapılır ve bu endojen üretim D vitaminin temel kaynağıdır.(69) Ergokalsiferol, bitkisel kaynaklı olup süt ürünlerinin güçlendirilmesi amacıyla kullanılır. Vitamin D3 ve

D2 benzer yollarla metabolizma olur. Bu nedenle ikisine birden D vitamini denir.(70,72) D vitamini karaciğerde deriden gelen kolekalsiferol ile beraber 25-hidroksilaz enzimi tarafından hidroksile edilir ve 25(OH)D3'e dönüşür. 25(OH)D3 dolaşımda bulunan D vitamini metabolitidir. Yarı ömrü yaklaşık 20 gündür.(71,73) Bu nedenle 25(OH)D3; D vitaminin sentez, alım ve harcanması gibi durumları en iyi yansıtan değer olarak kabul edilir.(74,75) 25(OH) D3, D vitamini bağlayan proteine (DBP) bağlanarak böbreğe gider. Kortikal hücrelerde 25(OH)D3 serum kalsiyum, fosfor ve PTH'ya bağımlı olarak hidroksilasyona uğrar. Kalsiyum ve fosfor seviyesi düşük PTH seviyesi yüksek olur ise 1 alfa hidroksilaz enzimi aktive olur ve 1,25(OH)2 D3 sentezlenir. Bu form D vitaminin en aktif formudur. (Şekil 2) Bu hormonun reseptörleri 30'u aşkın hedef dokuda transkripsiyon ve nongenomik olarak regülasyon gösterir. 25(OH)2D3 serum seviyesi için 12-40ng/ml normal değerlerdir. Serum 1,25(OH)2 D3 ise yaşa göre değişmektedir ve çocuklarda erişkinlerden daha yüksektir. 25(OH)2D3'den farklı olarak mevsimsel değişiklik göstermez.(76)

Aktif D vitaminin temel görevi, intestinal olarak kalsiyum ve fosfor emilimini sağlamak ayrıca PTH'nun uyardığı osteoklastik kemik rezorbsiyonuna yardımcı olmaktır. Ekzojen D vitamini verilmesi bağırsakta kalsiyum emilimini ve kemikten kalsiyum rezorbsiyonunu artırarak hiperkalsemi meydana gelmesine neden olur.

D vitamini intoksikasyonlarında serum 25(OH)D3 düzeyleri yüksekken serum 1,25(OH)2D3 düzeyi normal ya da yüksek, serum PTH düzeyi düşük olup hiperfosfatemi, hiperkalsemi ve hiperkalsiüri görülür.(77) D vitamini intoksikasyonu stoss tedavileri sırasında nadir olarak görülür. Daha sık olarak hipoparatiroidizm, hipofosfatemik rikets, psödohipoparatiroidizm ve renal osteodistrofisi olan hastaların tedavisi sırasında görülür.(77)



Şekil2. D vitamini metabolizması

D vitamini hipervitaminozunda hiperkalsemi ve hiperkalsiüriye bağlı klinik bulgular görülebilir.(78) D vitamin intoksikasyonları genellikle iyatrojeniktir. Sağlık personellerinin rikets olmayan hastalara yüksek doz önermesi ya da ailenin yanlış uygulamaları sonrasında oluşur.(79) Amerikan Pediatri Akademisi tarafından 2008'de son önerilen yeterli D vitamini alımı miktarı 400İÜ/gündür.(80) Kanada Pediatri Akademisi anne sütü alan bebeklere yazın 400İÜ/gün, kışın ise 800İÜ/gün D vitamini önermektedir.(81) İngilterede tüm çocuklar için üç yıl, risk grupları için ise beş yıl D vitamini desteği önerilir.(82. Ülkemiz de ise tüm bebeklere ilk ay içinde 400İÜ/gün D vitamini başlanması önerilmektedir.

2.6.1. Vitamin D Reseptörü

D vitaminin aktif formu olan 1,25(OH)2D3 VDR'e bağlanarak kemik matriksi gama-karboksiglutamik asit proteinini veya osteokalsini, PTH'unu ve kalsitonin sentezini ayarlayan santral bir kalsiyum homeostazis regülatörüdür.(83,84) VDR steroid-tiroid-retinoik asit reseptör üst ailesine ait 50-60kDa'lık bir selüler

polipeptittir ve retinoid X reseptörü ile heterodimerik bir kompleks oluşturur. VDR, hedef hücrelerdeki nükleer DNA ile ilişkilidir. Bir dizi cevaba veya selektif gen transkripsiyonunu baskılamaya aracılık eden spesifik RNA kodlayıcı proteinlerin sentezini başlatır. VDR geni 12q12-14'de haritalanmıştır ve 9 ekson kapsar.(85,86)

D vitaminin hücre proliferasyonunu kalsiyum absorpsiyonu ve hücre farklılaşmasını regüle ettiği bilinmektedir. D vitaminin etkisi VDR'ye bağımlıdır. VDR genindeki herhangi bir defekt kalsiyum metabolizmasını etkileyerek kalsiyum taşı oluşum riskini artırmaktadır.(87)



III.MATERYAL-METHOD

3.1.Deneysel Çalışma

Bu çalışma Ekim ile Aralık 2016 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmada sağlıklı Wistar albino türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma 7 gün sonunda sonlandırıldı. Sıçanlardan idrar örnekleri toplandı, 7.gün sıçanların histolojik olarak böbrek dokuları ve real time PCR için böbrek dokuları protokollerine uygun şekilde alındıktan sonra sıçanlar sakrifiye edildi.

3.2.Deney Hayvanları

Çalışmaya ağırlıkları 250 ± 50 gram; yaşları 6-8 haftalık 28 adet Wistar albino türü sağlıklı erkek sıçan alındı. Sıçanlar rastgele olarak 4 gruba ayrıldı. Her gruba 7 sıçan ayrıldı. Sıçanlar 2 hafta boyunca adaptasyon için herhangi bir sağlık problemi belirtisine karşı bekletildiler. Çalışma boyunca hayvanlar stabil koşullar altında (22°C sıcaklık, % 30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat) tutuldular. Sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı. İşlem anestezileri [Ketamin (75 mg/kg) + Xylazine (10 mg/kg)] ile sağlanmıştır. Denekler 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 (sağlam, kontrol grubu): Grup rastgele seçilen 7 sıçandan oluşturuldu. Başlangıcında iv olarak serum fizyolojik verildi. Sonrasında intraperitoneal olarak serum fizyolojik verilmeye devam edildi. Çalışma sonlanıncaya kadar serum fizyolojik verildi. Sıçanlardan bir tanesi çalışma içerisinde öldü.

Grup2 (PAN ile oluşturulmuş nefrotik sendrom grubu): Grup rastgele seçilen 7 sıçandan oluşturuldu. Bu gruptaki sıçanlara deneysel nefrotik sendrom oluşturmak için daha önce yapılan pilot çalışmada olduğu gibi 10mg/100gr olacak şekilde PAN kuyruk veninden intravenöz olarak enjekte edildi. Çalışma sonlanıncaya kadar hergün intraperitoneal olarak serum fizyolojik verildi. Sıçanlardan bir tanesi çalışma içerisinde öldü.

Grup 3 (D vitamini grubu): Grup rastgele seçilen 7 sıçandan oluşturuldu. Bu gruptaki sıçanlara deneysel nefrotik sendrom oluşturmak için daha önce yapılan pilot çalışmada olduğu gibi 10mg/100gr olacak şekilde PAN kuyruk

veninden intravenöz olarak enjekte edildi. Sonrasında her gün düzenli olarak 0,4 µg/kg/gün dozunda 1,25 (OH)₂ D 3 intraperitoneal olarak uygulandı. Sıçanlardan bir tanesi çalışma içerisinde öldü.

Grup 4 (parikalsitol grubu): Grup rastgele seçilen 7 sıçandan oluşturuldu. Bu gruptaki sıçanlara deneysel nefrotik sendrom oluşturmak için daha önce yapılan pilot çalışmada olduğu gibi 10mg/100gr olacak şekilde PAN kuyruk veninden intravenöz olarak enjekte edildi. Sonrasında hergün 240ng/kg/gün dozunda parikalsitol yine intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Sıçanlardan bir tanesi çalışma içerisinde öldü.

Tablo 6. Çalışma grupları

Grup	n	Aldığı İlaçlar
Grup 1 Kontrol Grubu	6	-
Grup 2 Nefrotik Sendrom	6	PAN
Grup 3 D Vitamini Grubu	6	PAN- 1,25 (OH) ₂ D 3
Grup 4 Parikalsitol Grubu	6	PAN-Parikalsitol

3.3. Method

Çalışmaya başlamadan önce Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay alındı. Çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları merkezinde gerçekleştirildi. Çalışmaya alınacak hayvanların cinsiyetleri ve yaşları belirlendi. Çalışmaya 6-8 haftalık 28 sıçan dahil edildi. Sıçanlar rastgele olarak 4 gruba ayrıldı. Her grup 7 sıçandan oluşturuldu. Sıçanların sağlık durumları kontrol edildi ve numaralandırıldı.

PAN üretici firmanın şartlarına uygun olarak hazırlandı. Hastaların kuyruk tüyleri tıraşlandıktan sonra sıcak suya daldırılarak kuyruk venleri belirginleştirildi. Sonrasında 10mg/100gr olacak şekilde PAN intravenöz olarak uygulandı. Sıçanların semptomlarının 24 saat sonrasında olduğu bilinmektedir(60). Sıçanlara sonrasında 1 haftalık tedavi uygulamaları başlatıldı. Gruplardaki tüm sıçanlar 12 saatlik aydınlık/karanlık periyodunda tutularak, standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendiler. Kontrol grubuna tedavi verilmedi. Nefrotik sendrom (grup 2), D vitamini (grup 3) ve parikalsitol (grup 4) gruplarındaki sıçanlara deney başlangıcında intravenöz olarak kuyruk

veninden 10mg/100gr olacak şekilde PAN verildi. Nefrotik sendrom grubuna sonrasında intraperitoneal olarak serum fizyolojik uygulandı. D vitamini grubuna hergün 0,4 µg/kg/gün dozunda 1,25 (OH)₂ D 3 intraperitoneal olarak uygulandı. Parikalsitol grubuna hergün 240ng/kg/gün dozunda parikalsitol yine intraperitoneal olarak uygulandı. Çalışma bir haftanın sonunda sonlandırıldı.

Sıçanlardan 0. 4. ve 7. günlerde spot idrar toplandı. Bu işlem sıçanların mesanelerine masaj yapılarak gerçekleştirildi.

Deney sonunda sıçanlara Ketamin (75 mg/kg) (Ketalar, 002038, Eczacıbaşı Sağlık Ürünleri Sanayi ve Ticaret AŞ. Lüleburgaz, Türkiye) + Xylasine (10 mg/kg) (Alfazyne, 0804125-11, Alfasan, Woerden, Holland) anestezisi intraperitoneal olarak uygulandı. Anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edilen sıçanlardan alınan böbrek dokusunun bir kısmı histolojik inceleme için %10'luk formalin tespit solüsyonuna ve bir kısmı da PCR analizi için RNA latter solüsyonuna alındı.

İdrar analizi: Spot idrarda protein/kreatinin oranı ile değerlendirilmiştir. Sıçanlardan alınan 0, 4. ve 7. günlerdeki idrarlardan çalışılmıştır. İdrarlar Hitachi 902 model otomatik analizatörde çalışılmıştır. Analizatör minimum 20ul idrar analiz edebilmektedir. İdrar analizi özel bir laboratuvar da çalışılarak sonuçlar elde edilmiştir.

Parafin Doku Takibi: Alınan böbrek örnekleri ışık mikroskobu ile değerlendirilmek üzere %10 formalin solüsyonu içerisine alınarak tespit edilmişlerdir. Rutin parafin doku takibi protokolüne uygun olarak takip edilmişler ve parafin blok halinde gömülmüşlerdir. Kısaca, 24-48 saat %10'luk formalin ile tespit edilen doku örnekleri bir gece akarsu altında bırakılarak yıkanmıştır. Derecesi giderek artan etil alkol serileri ile (%60-70-80-90-96) dehidratasyonları yapıp, iki değişim ksilen ile şeffaflaştırılmaları sağlanıp, parafine emdirme aşamasından sonra parafine gömülmüşlerdir. (Tablo 7). Elde edilen parafin bloklardan rotary mikrotomla (RM 2135, Leica) polilizin ile kaplı lamlara 5 µm kalınlığında alınan kesitler histokimyasal olarak hematoksilin ve eozin (Tablo) ile immunohistokimyasal olarak anti-Nefrin ve

anti-Podosin primer antikorları kullanılarak avidin-biotin-peroksidaz indirek immunohistokimyasal yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Tablo 7. Parafin takip protokolü

İşlem	Madde	Süre
Tespit	% 10 formalin	24- 48 saat
	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 60 etil alkol	30 dakika
	% 70 etil alkol	30 dakika
	% 80 etil alkol	30 dakika
	% 95 etil alkol	1 saat
	% 95 etil alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen-Alkol	30 dakika
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
Emdirme 60° C etüvde	Ksilen-Parafin	30 dakika
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Hematoksilen-Eozin Boyaması: Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C' lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için % 95' den % 60' a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akarsu altında yıkandı. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 2 dakika boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akarsuda yıkandı. Diferansiyasyon için asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler 5 dakika akarsu altında yıkandı. Daha sonra kesitler 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akarsu altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla % 80 ve % 95' lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 8).

Tablo 8. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	30 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	2 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 alkol	1 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

Avidin-Biyotin-Peroksidaz tekniği ile İndirek İmmünohistokimyasal

Yöntem: Formalin ile tespit edilmiş parafine gömülmüş dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak polilizin kaplı lamlar üzerine aktarılmıştır. Lamlar deparafinizasyon için 1 gece 60°C etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyon işlemini takiben kesitler iki değişim ksilen ile muamele edilmiştir. Rehidratasyon için azalan alkol serilerinden (%96-90-80-70-60) geçirilmiştir. Distile su ile 10 dakika yıkandıktan sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile 3 defa 5'er dakika yıkanmıştır. Kesitler %0,5'lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde 37°C de 10 dakika tutulmuştur. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ (H1009, Sigma-Aldrich, USA) uygulanmıştır. 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler anti-Nefrin (NBP1-19742, Novus Biologicals, USA) ve anti-Podosin (ab93650, Abcam, USA), primer antikorları ile 18 saat +4°C'de inkübe edilmiştir. PBS ile 3 defa yıkanan kesitler biotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz sekonder antikoru ile 30 dakika boyanmıştır. PBS ile yıkama işleminden sonra kesitlere 30 dakika streptavidin (Histostain®-Plus Bulk Kit Cat No:85-9043- Invitrogen,

Carlsbad, California, United States) uygulanmıştır. İmmunoreaktivitenin görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB, Histostain-Plus IHC Kit, DAB, broad spectrum Cat No: 859643, Invitrogen, Carlsbad, California, United States) ile 5 dakika boyanan kesitlerin, artalan boyaması ise Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile sağlanmıştır. %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler, 30 dakika ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatılmıştır ve ışık mikroskobu (BX43, Olympus) ile fotoğrafları çekilmiştir. İmmunoreaktivite boyanma sonuçları hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirilmiştir.

Podosin ve Nefrin gen ekspresyonlarının Real Time PCR yöntemi ile Belirlenmesi

RNA latter solüsyonu içerisine alınan böbrek örneklerinin laboratuvar transportunun ardından RNA izolasyonu için;

1. Doku homojenizasyonunu sağlamak için ilk aşamada iki farklı boyutta boncuk (2.3 ve 6.3 mm) içeren 2 ml vida kapaklı tüpe 1.7 ml TRIzol ilave edildikten sonra 0,5 g doku tüpe eklenmiştir.
2. En fazla 6 örnek homojenizatör cihazına karşılıklı olarak konulmuştur.
3. Örnekler 30 sn cihazda aralıklı dört kez homojenize edilmiş, tekrar aralarında ise örnekler, sürtünmeden çıkan ısıyı engellenmesi amacıyla 30 sn buz içinde bekletilmiştir.
4. Homojenize olmuş doku/TRIzol karışımından 1.5 ml, 2 ml'lik tüplere aktararak 5 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonrası örneklerin üzerine 300 µl saf moleküler biyoloji grade kloroform eklenmiş, 15 sn elle yavaşça çalkalandıktan sonra 3 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon sonrası örnekler soğutmalı 4 °C'da 12.000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir.

7. Santrifüj sonrası örneklerin bulunduğu tüplerin üst kısmında oluşacak opak renkli fazın 600 µl'si yeni bir 2ml'lik tüpe aktarılmıştır.

8. Yeni tüpe aktarılan örneklerin üzerine 600 µl %70'lik etanol eklenmesinin ardından 1200 µl iki basamakta filtreli spin kolona aktarılmıştır.

9. Spin kolonlar 12.000 g'de 15 sn santrifüj edildikten sonra spin kolonun alt kısmında bulunan ve artık sıvının bulunduğu tüp atılarak yenisi takılmıştır.

10. 750 µl wash buffer 1 spin kolonlara yüklenerek spin kolonlar 12.000 g'de 15 sn santrifüj edilmesinin ardından spin kolonun alt kısmı atılarak yeni tüp takılmıştır.

11. 600 µl wash buffer 2 spin kolonlara yüklenerek spin kolonlar 12.000 g'de 15 sn santrifüj edilmesinin ardından spin kolonun alt kısmı atılarak yeni tüp takılmıştır.

12. Spin kolonun alt kısmı atılıp 1.5 ml'lik tüp eklenmiş, spin kolon filtresinin orta kısmına doğru 50 µl RNase-Free su eklenmiştir.

13. Oda sıcaklığında örnekler 1 dk inkübe edilerek spin kolonlar 15.000 g'de 2 dk santrifüj edilmiştir.

14. 1.5 ml'lik tüplerde örneklere ait RNA'lar elde edilerek 50 µl'lik RNA örnekleri 4 eşit hacme bölünerek -80 °C'da muhafaza edilmiştir.

NanoDrop cihazı ile izole edilen RNA örneklerinin A260/280 absorpsiyon oranı ve RNA konsantrasyonu belirlenmiştir. (NanoDrop ND-100). RNA konsantrasyonu 30 nanogramın altında, 260/280 saflığı 1,8 altında ve 260/230 oranı 1,4 altında olan örnekler tekrar izolasyon işlemine alınmıştır. Ek olarak RNA kalitesi ve bütünlüğü için SAFE-T-Stain varlığında bleach agaroz jelde yürütülerek incelenmiştir.

Tüm örneklerden RNA konsantrasyonu 30 ng/µl'de eşitlenecek şekilde cDNA sentezinin ardından nefrin ve podosin spesifik primerler ile Real Time PCR yöntemi kullanılarak ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Gruplar arasındaki ekspresyon farklılıkları housekeeping gen kullanılarak Livak

metodu ile değerlendirilmiştir. B2M geni olarak B2M 5'GTGACCGTGATCTTTCTGG, B2M 5'TTTGAGGTGGGTGGAACTGA primeri kullanılmıştır. Nefrin primeri olarak Nf1 5' TCCCGAGCTTGTGTCTCCTA Nf1 5' GTGACCACATACTCCTGCCC kullanılmıştır. Podocin primeri olarak pF1 5' AAGAAAGTCAAAGGCCGGGAG , pF1 CTCGTCCACATTCACTACCGT kullanılmıştır.

Yapılan çalışmamızdaki işlemler 3R kuralına (reduction, replacement, refinement) uyularak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 16.05.2004'de resmi gazetede Tarım ve Köyşleri Bakanlığının "Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar için Kullanılan Deney Hayvanlarının Üretim Yerleri ile Deney Yapacak Olan Laboratuvarların Kuruluş, Çalışma, Denetleme, Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik"ve 24.06.2004'de yayınlanan 5199 sayılı "Hayvanları Koruma Kanunu"na uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı analiz: Her 4 grup için elde edilen değişkenler tanımlayıcı olarak, nonparametrik olduğundan; ortanca (min-max) değerleri ile ifade edilmiştir. Kategorik değişkenler, (histolojik sınıflama vb) sayı ve yüzde dağılımlarla incelenmiştir.

Analitik değerlendirme

1.Üç tekrarlı ölçüm yapılarak proteinüri karşılaştırması: 4 bağımsız grup ve 3 tekrarlı ölçüm (0. 4. 7. gün) yapılan değişken için Genelleştirilmiş Doğrusal Model (GLM) ile analiz gerçekleştirilmiş bu analizde artık kareler toplamının (unstandardized residuals) normal dağılması durumunda sonuçlar yorumlanmıştır. Fakat gruplar arasında interaction olması nedeniyle kullanılamamıştır. (tablo 9). Kareler(residuals) normal dağılıma uygunluk gösteriyor olmasına rağmen interaction nedeniyle nonparametrik değerlendirmelere geçilmiştir. Her grubun kendi içinde üç tekrarlı denemeleri (bağımlılık var) Friedman varyans analizi ile değerlendirilerek, her grup için bulunan tekrarlar arasındaki istatistiksel anlamlılıklar kontrol edilmiştir. Ayrıca her grup için son ölçümler arasındaki farklılık nonparametrik koşulda bağımsız

dört grubun karşılaştırılmasında Kruskal Wallis(KW) Varyans Analizi ile çözümlenmiştir. Friedman ve KW analizi sonrasında istatistik anlamlılık saptanmış, farkın hangi ikili karşılaştırmalardan kaynaklandığını belirlemek için post hoc karşılaştırmalarda Dunn teoremine dayalı nonparametrik ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. PAWS (SPSS-IBM) 22.0 software programı ile veri analizleri gerçekleştirilmiştir, $p < 0.05$ anlamlılık değeri olarak alınmıştır.

2.Histolojik skorlamalar için sayım değerlerinin karşılaştırılmasında Ki-kare testi uygulanmış $p < 0.05$ anlamlılık değeri olarak alınmıştır.

Tablo 9. GLM modellemesi

	ANOVA F testi	p.	Eta kare η^2	Gözlenen güç (power)
Grup-İçi Tekrarlar Arası Fark (Within Subject Effect)				
Protein/Kreatinin Oranı	25,996	0,000	0,565	1,000
Protein/Kreatinin Oranı * GRUPLAR (Interaction Effect)	5,130	0,001	0,435	0,985
Gruplar Arası Fark(Between Subject Effect)				
	19,830	0,000	0,748	1,000

IV.BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen sıçanların özellikleri, verilen ilaçlar(nefrotik sendrom oluşturmak ve oluşturulan nefrotik sendromu tedavi etmek için), idrar örnekleri, böbreklerden elde edilen doku örnekleri ve RNA örneklerinin sayıları median değerler ve minimum-maximum şeklinde tablolar halinde sunuldu. İstatistiksel olarak anlamı olan median değerle ilgili tablolara p değeri ayrıca ifade edildi.

İdrarda protein/kreatinin oranı: Sıçanlardan toplanan spot idrarlar hizmet alımı yapılan kuruma soğuk zincir korunarak iletildi. Sonuçlar tarafınıza yaklaşık olarak 2 gün sonrasında ulaştı. İdrarlar masaj yapılarak toplandı. Sıçanlardan 0.gün, 4.gün ve 7.günde idrar örnekleri alındı. Her gruptan 3 tekrar idrar örnekleri alındı. Labaratuar sonuçları protein değerleri gram olarak kreatinin değerleri miligram olarak alındı. Protein değerleri miligrama çevrildi ve sonrasında protein/kreatinin(mg/mg) değerleri oluşturuldu. GLM ile istatistik yapılması planlandı. Değerlerin normal dağılmasına rağmen interaction olması nedeniyle nonparametrik olarak Kruskal Wallis ve Fredmann Analizi ile değerlendirildi.

Kontrol grubunun 0.gün spot idrar medianı 1,75(1,40-1,90), 4.gün medianı 1,75(1,40-2,00), 7 gün medianı 1,65(1,40-2,00) olarak bulunmuştur. Nefrotik sendrom grubunun 0.gün spot idrar medianı 1,80(1,50-1,90), 4.gün medianı 2,15(2,00-2,40), 7 gün medianı 2,15(1,80-2,50) olarak bulunmuştur. D vitamini grubunun 0.gün spot idrar medianı 1,00(0,70-1,40), 4.gün medianı 1,45(1,20-1,80), 7 gün medianı 1,85(1,60-2,20) olarak bulunmuştur. Parikalsitol grubunun 0.gün spot idrar medianı 1,25(0,90-1,60), 4.gün medianı 1,40(1,10-1,80), 7 gün medianı 1,90(1,70-2,30) olarak bulunmuştur.

Kontrol grubunun 0.gün [median1,75(1,40-1,90)],4.gün[median 1,75(1,40-2,00)] ve 7.gün [median 1,65(1,40-2,00)] protein kreatinin değerleri kendi aralarında karşılaştırdıklarında rakamsal ya da istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır (p = 0,957). (Tablo 10)

Tablo 10. Kontrol grup proteinürisi

	Median (min-max)	p
0.gün	1,75(1,40-1,90)	0,957
4.gün	1,75(1,40-2,00)	
7.gün	1,65(1,40-2,00)	

Nefrotik sendrom grubunun 0.gün[median 1,80(1,50-1,90)], 4.gün [median 2,15 (2,00-2,40)] ve 7.gün [median 2,15 (1,80-2,50)] protein kreatinin oranları arasında anlamlı fark bulunmaktadır(p = 0015). Posthoc analizlerine bakıldığında 0.gün ve 7.gün protein/kreatinin oranlarında rakamsal olarak fark bulunmakla beraber istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır (p = 0,13). 0.gün ve 4.gün protein/kreatinin oranlarına bakıldığında rakamsal olarak 4.gün, 0.günden fazladır ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p = 0,018). 4.gün ve 7.gün protein/kreatinin oranları arasında rakamsal ve istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır(p = 1,0). (Tablo 11)

Tablo 11. Nefrotik sendrom grubu proteinürisi

	Median(min-max)	p*	posthoc	p**
0.gün (0)	1,80(1,50-1,90)	0,015	0-7 gün	0,130
4.gün (4)	2,15(2,00-2,40)		0-4 gün	0,018
7.gün (7)	2,15(1,80-2,50)		4-7 gün	1,000

*Nonparametrik koşulda 4 grup dağılımı testi Kruskal Wallis

**Nonparametrik koşulda Dunn teoremine dayalı çoklu karşılaştırma testleri

D vitamini grubunda 0.gün[median 1,00 (0,70-1,40)], 4.gün [median 1,45(1,20-1,80)]ve 7.gün[median 1,85(1,60-2,20)] protein kreatinin oranları arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmıştır(p = 0,030) . Posthoc analizlerine bakıldığında 0.gün ve 4.gün proteinin kreatinin oranlarında rakamsal olarak fark oluşmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır (p = 0,25). 0.gün ve 7.gün protein kreatinin oranlarında rakamsal fark ve istatistiksel anlamlılık mevcuttur. 7.günün protein/kreatinin oranının; 0. günden istatistiksel olarak anlamlı farklılığı saptanmıştır(p = 0,028). 4.gün ve 7.gün protein kreatinin oranları arasında rakamsal olarak farklılık olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır (p = 1,000). (Tablo 12)

Tablo 12. D vitamini grubu proteinürisi

	Median(min-max)	p*	posthoc	p**
0.gün(0)	1,00(0,70-1,40)	0,030	0-7 gün	0,250
4.gün(4)	1,45(1,20-1,80)		0-4 gün	0,028
7.gün(7)	1,85(1,60-2,00)		4-7 gün	1,000

*Nonparametrik koşulda 4 grup dağılımı testi Kruskal Wallis

**Nonparametrik koşulda Dunn teoremine dayalı çoklu karşılaştırma testleri

Parikalsitol grubunun 0.gün [median 1,25(0,90-1,60)], 4.gün[median 1,40(1,10-1,80)] ve 7.gün [median 1,90(1,70-2,30)] protein kreatinin oranı arasında rakamsal farklılık saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlıdır.(p = 0,080). Yapılan posthoc analizlerde 4.gün, 0.günden rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır(p = 0,582). 7.gün analizlerinde, 0.günden rakamsal farklılık saptanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır. (P = 0,007). 7.gün, 4.günden rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanamamıştır(p = 0,250). (Tablo13)

Tablo13. Parikalsitol grubu proteinürisi

	median	p*	posthoc	p**
0.gün(0)	1,25(0,90-1,60)	0,008	0-7 gün	0,582
4.gün(4)	1,40(1,10-1,80)		0-4 gün	0,007
7.gün(7)	1,90(1,70-2,30)		4-7 gün	0,250

*Nonparametrik koşulda 4 grup dağılımı testi Kruskal Wallis

**Nonparametrik koşulda Dunn teoremine dayalı çoklu karşılaştırma testleri

İdrar protein kreatinin oranları kendi içlerinde karşılaştırılmıştır. Sonrasında ise gruplar birbirleri ile de karşılaştırılmıştır. 0.gündeki protein kreatinin oranları gruplar arasında karşılaştırıldı. Kontrol[median 1,75(1,40-1,90)], nefrotik sendrom [median 1,80(1,50-1,90)], D vitamini [median 1,00(0,70-1,40)]ve parikalsitol[median 1,25(0,90-1,60)] gruplarının protein kreatinin oranları karşılaştırıldığında rakamsal farklılık ve istatistiksel anlamlılık sağlanmıştır (p = 0,028). Posthoc analizleri yapılmıştır. Kontrol grubunun protein kreatinin oranı nefrotik sendrom grubunun protein kreatinin oranından rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık sağlanamamıştır(p= 1,000). Nefrotik sendrom grubunun protein kreatinin oranı parikalsitol grubunun protein kreatinin oranından rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel

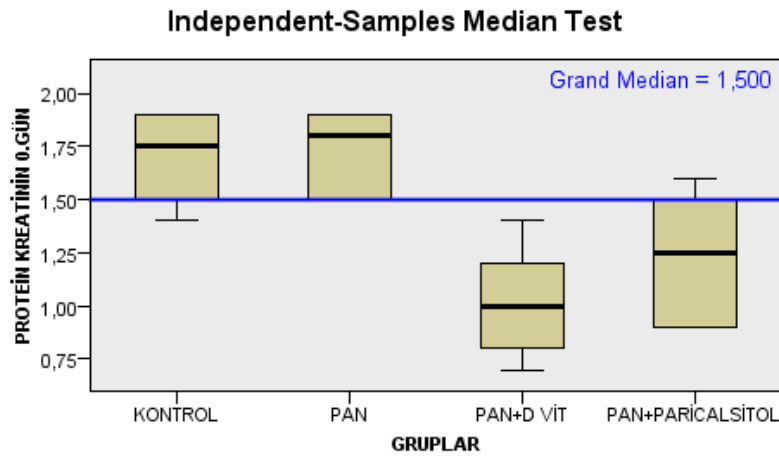
anlamlılık saptanmamıştır ($p = 0,474$). Kontrol grubunun protein kreatinin oranı parikalsitol grubunun protein kreatinin oranından rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır($p = 0,474$). Nefrotik sendrom grubunun protein kreatinin oranı ile D vitamini grubunun protein kreatinin oranı arasında rakamsal olarak farklılık sağlanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır. ($p = 0,003$) Kontrol grubunun protein kreatinin oranı ile D vitamini grubunun protein kreatinin oranı arasında rakamsal farklılık saptanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır.($p = 0,020$). Parikalsitol grubunun protein kreatinin oranı D vitamini grubunun protein kreatinin oranından rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır($p = 1,000$). (Tablo14)

Tablo14. 0. gün grupların protein/kreatinin oranı karşılaştırması

Gruplar	Median (Min-Max)	P*	Posthoc gruplar	p**
Kontrol (K)	1,75(1,40-1,90)	0,028	K-P	1,000
PAN (P)	1,80(1,50-1,90)		C-P	0,474
PAN+D Vit (D)	1,00(0,70-1,40)		C-K	0,474
PAN+Parikalsitol (C)	1,25(0,90-1,60)		D-P	0,003
			D-K	0,020
			D-C	1,00

*Nonparametrik koşulda 4 grup dağılımı testi Kruskal Wallis

**Nonparametrik koşulda Dunn teoremine dayalı çoklu karşılaştırma testleri



Şekil 3. Gruplara göre 0.gün protein/kreatinin oranının dağılımı

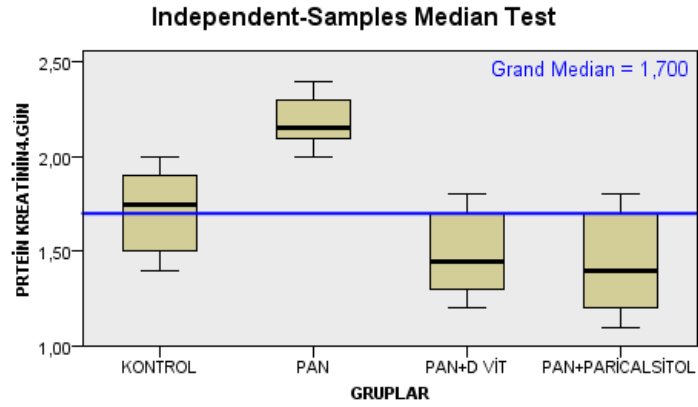
4.gün protein kreatin oranları kontrol, nefrotik sendrom, D vitamini ve parikalsitol grupları arasında karşılaştırmaları yapılmıştır. Bu karşılaştırmada anlamlı istatistiksel farklılık saptanmıştır($p = 0,010$). Nefrotik sendrom grubunun protein/kreatinin oranı kontrol grubunun protein/kreatinin oranından rakamsal olarak fazladır ve bu durum istatistiksel olarak anlamlıdır($p = 0,020$). Nefrotik sendrom grubunun protein/kreatinin oranı D vitamini grubuna göre rakamsal olarak fazladır ve bu fazlalık istatistiksel olarak anlamlıdır($p = 0,003$). Kontrol grubunun protein/kreatinin oranı D vitamin grubunun protein/kreatinin oranına göre rakamsal olarak fazla olsa da istatistiksel olarak anlamlılık sağlanamamıştır($p = 1,000$). Nefrotik sendrom grubunun protein/kreatinin oranı parikalsitol grubuna göre rakamsal olarak fazladır ve bu durum istatistiksel olarak anlamlıdır($p = 0,003$). Kontrol grubunun protein /kreatinin oranı parikalsitol grubuna göre rakamsal olarak fazladır fakat istatistiksel anlamlılık sağlanmamıştır($p = 1,000$). D vitamini grubunun protein kreatinin oranı parikalsitol grubuna göre rakamsal olarak fazladır fakat istatistiksel anlamlılık sağlanamamıştır($p = 1,000$). (Tablo 15)

Tablo 15. 4.gün protein kreatinin oranlarının gruplar arası karşılaştırılması

Gruplar	Median (Min-Max)	P*	Posthoc gruplar	p**
Kontrol (K)	1,75(1,40-1,90)	0,010	K-P	0,020
PAN (P)	2,15(2,00-2,40)		D-P	0,003
PAN+D Vit (D)	1,45(1,20-1,80)		D-K	1,000
PAN+Parikalsitol (C)	1,40(1,10-1,80)		C-P	0,003
			C-K	1,000
			C-D	1,000

*Nonparametrik koşulda 4 grup dağılımı testi Kruskal Wallis

**Nonparametrik koşulda Dunn teoremine dayalı çoklu karşılaştırma testleri



Şekil 4. Gruplara göre 4.gün protein/kreatinin oranının dağılımı

Kontrol[median 1,65(1,40-2,00)], nefrotik sendrom[median 2,15(1,80-2,50)] , D vitamini[median 1,85(1,60-2,00)] ve parikalsitol[median 1,90(1,70-2,30)] grupları 7.gün protein kreatinin oranı açısından değerlendirildi. Gruplar arasında rakamsal farklılık olmasına rağmen anlamlı istatistiksel fark saptanamamıştır ($p = 0,337$). (tablo 16)

Tablo 16. 7.gün idrar protein kreatinin oranın gruplar arası karşılaştırılması

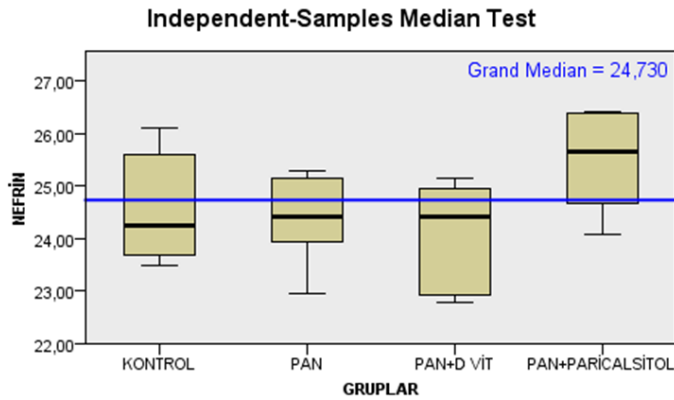
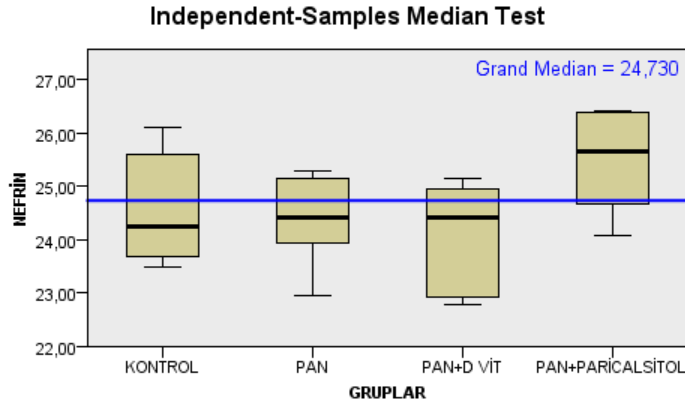
	Median(min-max)	P
Kontrol (K)	1,65(1,40-2,00)	0,337
PAN (P)	2,15(1,80-2,50)	
PAN+D Vit (D)	1,85(1,60-2,00)	
PAN+Parikalsitol (C)	1,90(1,70-2,30)	

Nefrin mRNA : Nefrin mRNA ekspresyon farkı median değerleri kontrol grubunda median 24,24ct(23,48-26,11), nefrotik grupta(PAN) 24,41ct(22,94-25,30), D vitamini grubunda 24,40ct(22,77-25,14), parikalsitol grubunda 25,06 ct (24,07-26,42) olarak bulunmuştur. Kontrol grubu, nefrotik grup, d vitamini grubu ve parikalsitol grubu karşılaştırıldığında parikalsitol grubunda nefrotik sendrom grubuna göre rakamsal olarak yükseklik bulunup istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.($p = 0,721$) D vitamini grubunun nefrotik sendrom grubuna göre rakamsal farkı saptanamamıştır. Nefrotik sendrom grubunun kontrol grubuna göre rakamsal üstünlüğü olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır. Parikalsitol grubunda d vitamini grubuna göre

rakamsal yükseklik olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır. (p = 0,721)(Tablo 17)

Tablo 17. Nefrin mRNA ekspresyon farkı median değerleri

	Median (min-max)	p*
Kontrol	24,24 (23,48-26,11)	0,721
PAN	24,41 (22,94-25,30)	
PAN+D vit	24,40 (22,77-25,14)	
PAN+Parikalsitol	25,06 (24,07-26,42)	



Şekil 5. Gruplara göre nefrin mRNA ekspresyon farkı podosin mRNA ekspresyon farkı

Pododin mRNA : Pododin mRNA ekspresyon farkı median değerleri kontrol grubunda median 22,48ct(21,89-22,97), nefrotik grupta(PAN) 22,06 (21,81-22,06), D vitamini grubunda 22,07 ct (21,91-22,54), parikalsitol grubunda 22,55ct (22,42-23,02) olarak bulunmuştur. Kontrol, nefrotik sendrom, D vitamini ve parikalsitol karşılaştırılmasında anlamlılık saptanmıştır (p = 0,007). Yapılan posthoc analizde anlamlılığın parikalsitol grubunun gen ekspresyon farkının nefrotik sendrom grubuna göre hem rakamsal hemde istatistiksel farklıktan kaynaklı olduğu saptanmıştır(p= 0,003). Nefrotik sendrom grubunun D vitamini grubuna rakamsal ve istatistiksel farklılığı saptanmamıştır(p = 1,0). Nefrotik sendrom grubunun kontrol grubuna rakamsal farklılığı olmasına rağmen istatistiksel farklılık saptanmamıştır (p = 1,0). D vitamini grubunun; kontrol grubuna rakamsal farklılığı olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık sağlanamamıştır (p = 0,474). D vitamini grubunun parikalsitol grubuna rakamsal farklılığı olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık sağlanamamıştır. (p = 0,126). Parikalsitol grubunun; kontrol grubuna rakamsal farklılığı olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık sağlanamamıştır(p = 1,0).(tablo 18).

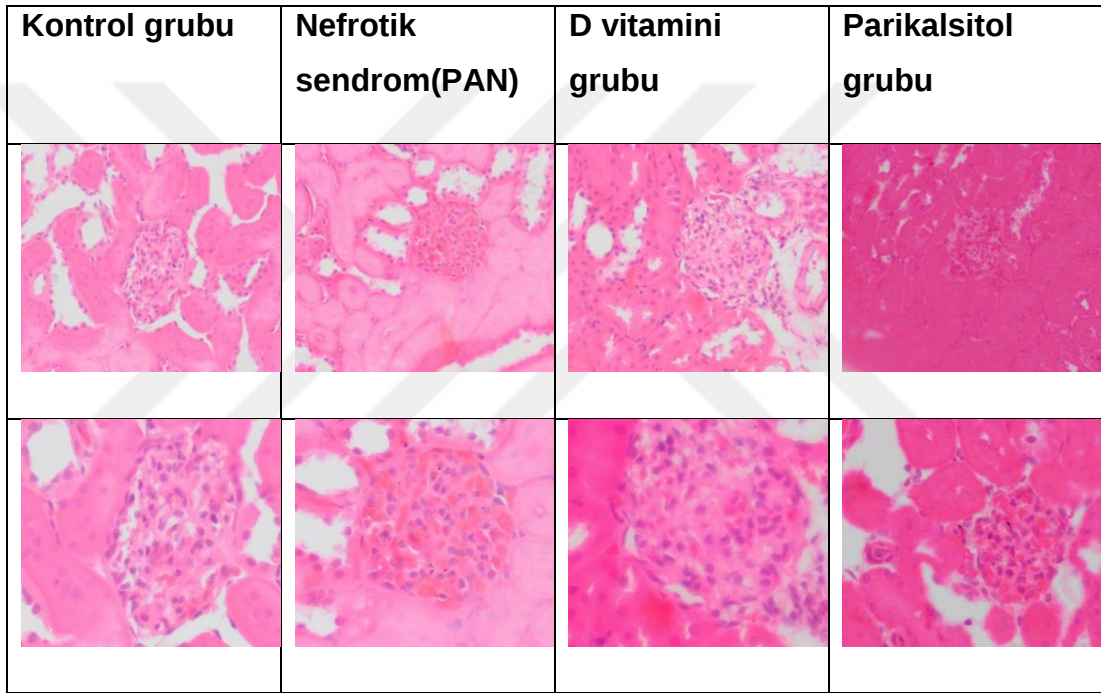
Tablo 18. Pododin mRNA ekspresyon farkı median değerleri ve posthoc analizi

Gruplar	Ortanca(Min-Max)	P*	Posthoc gruplar	p**
Kontrol (K)	22,48 (21,89-22,97)	0,007	P-D	1,00
PAN (P)	22,06 (21,81-22,06)		P-K	1,00
PAN+D Vit (D)	22,07 (21,91-22,54)		P-C	0,003
PAN+Parikalsitol (C)	22,55 (22,42-23,02)		D-K	0,474
			D-C	0,126
			K-C	1,00

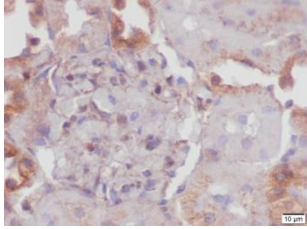
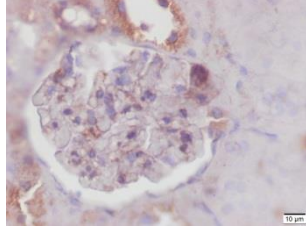
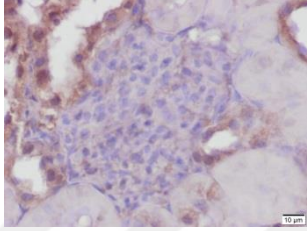
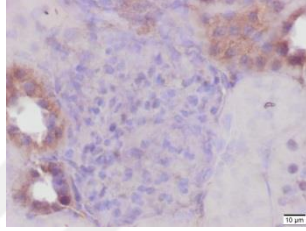
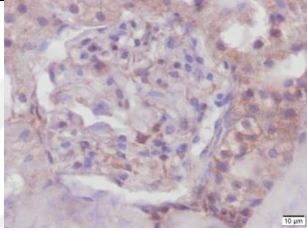
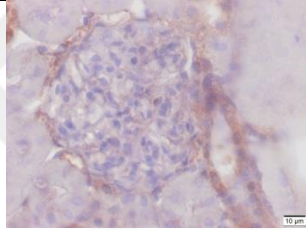
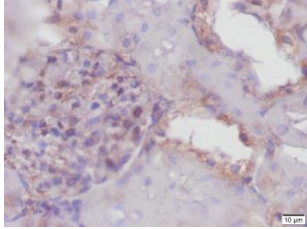
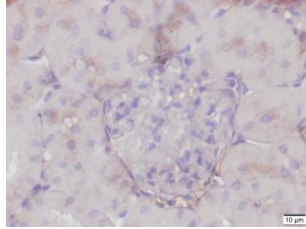
*Nonparametrik koşulda 4 grup dağılımı testi Kruskal Wallis

**Nonparametrik koşulda Dunn teoremine dayalı çoklu karşılaştırma testle

Böbrek doku histolojisi: Böbrek dokusu histolojik olarak hematoksilin eozin boyamaları yapıldı. Ayrıca podosin ve nefrin moleküllerinin immünohistokimyasal incelemeleri yapıldı. Yapılan hematoksilin eozin boyamada; kontrol grubunda renal histolojinin normal olduğu izlendi. Nefrotik sendrom (PAN)grubunda glomerülde hipersellülarite olduğu; parikalsitol ve D vitamini uygulanan gruplarda ise hipersellülaritenin minimal olduğu saptandı.(şekil 6)



Şekil 6.Kontrol, Nefrotik Sendrom, D vitamini ve Parikalsitol gruplarına ait histolojik kesitlerin Hematoksilin-Eozin ile boyalı örnekleri

	Nefrin	Podosin
Kontrol		
Nefrotik sendrom (PAN)		
D vitamini		
Parikalsitol		

Şekil 7 . Kontrol, Nefrotik Sendrom, D vitamini ve Parikalsitol gruplarına ait kesitlerde nefrin ve podosin primer antikorlarının immunohistokimyasal dağılımları.

Kontrol grubunda, nefrin immunoreaktivitesinin orta (2), podosin immunoreaktivitesinin ise hafif yer yer orta şiddette (1/2) glomerüllerde kapiller etrafında olduğu izlendi. Nefrotik sendrom(PAN) grubunda, nefrin ve podosin immunoreaktivitelerinin hafif (1) olduğu gözlemlendi. PAN ve D vitamini uygulanan

grupta, nefrin immunoreaktivitesinin orta (2), podosin immunoreaktivitesinin ise hafif (1) şiddette olduğu saptandı. PAN ve parikalsitol uygulanan grupta, nefrin immunoreaktivitesinin orta (2), podosin immunoreaktivitesinin ise hafif (1) şiddette olduğu saptandı. (tablo 20). Tüm gruplarda podosin immünreaktivitesi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır($p= 0,356$). Tüm gruplarda nefrin immünreaktivitesi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır($p= 0,475$). (şekil 7)

Tablo 19. Podosin immünhistokimyasal dağılımı

Gruplar	n		%		Ki kare p
	Hafif	Orta	Hafif	Orta	
Kontrol	2	4	%33,3	%66,7	0,852 0,356
PAN	5	1	%83,3	%16,7	
D vitamini	4	2	%66,7	%33,3	
Parikalsitol	4	2	%66,7	%33,3	

Tablo 20. Nefrin immünhistokimyasal dağılımı

Gruplar	n		%		Ki kare p
	Hafif	Orta	Hafif	Orta	
Kontrol	1	5	%16,7	%83,3	0,511 0,475
PAN	5	1	%83,3	%16,7	
D vitamini	3	3	%50	%50	
Parikalsitol	3	3	%50	%50	

V.TARTIŞMA

Steroid tedavisinin keşfinden önce nefrotik sendrom tedavisi olmayan bir hastalık olarak bilinmekteydi. Araya giren sekonder enfeksiyonlar ya da hastalığın son dönem böbrek yetmezliğine gitmesi ile kaybediliyorlardı (15,16). Steroid tedavisinin bulunması ile çocukluk dönemindeki nefrotik sendromların %80'i tedavi edilebilmiştir. Fakat MLH dışındakilerde başlangıçta ya da ilerleyen zamanlarda steroid direnci gelişmektedir(15, 16 ,24 ,88). Steroide yanıtız hastaların tedavileri için bugüne kadar siklofosamid, siklosporin A, azotioprin, klorambusil, takrolimus, MMF ve ritiksumab gibi ilaçlar denenmesine rağmen hala küçümsenemeyecek boyuttaki hastaların proteinürileri geriletilememiştir. Bu nedenle yeni tedavi denemeleri devam etmektedir(16, 88, 89).

5.1.Sıçanların Seçimi ve Bakımı

Daha önce yapılan çalışmalarda wistar türü sıçanların 6 aylık yaşam süresinden sonra yaşlanma ve bu yaşlanma ile birlikte böbrekte glomerülosklerozun arttığı ve buna ikincil proteinürinin ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu bilgiler bize sıçan seçimi açısından yol göstermiştir(90, 91, 92, 93). Bu çalışmaların yol göstericiliğinde çalışmamızda wistar albino yaşları ortalama 6-8 hafta(çocuk yaşına uyarlanarak) olan erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların bakımları diğer çalışmalarda da yer alan standart sıçan yemi ile beslenme, musluk suyu ve 12 saatlik aydınlık/karanlık periyodlarında tutulma şeklinde yapıldı. (92,93).

5.2.Deneysel Nefrotik Sendrom Modeli

Deneysel nefrotik sendrom modeli, nefrotik sendromun patofizyolojisinden sorumlu olan immünolojik olayların belirlenmesi, histopatolojik değişiklikler ve bunların biyokimyasal parametreler üzerindeki etkileri ve tedavilerin denemeleri için kullanılmakta ve bu tedavilerin yan etkileri değerlendirilmektedir(60,94). Deneysel nefrotik sendrom modeli oluşturmak için kullanılan püromisin ve adriamisin aminonükleozidi toksik etkileri ile sıçanlarda erken dönem MLH, geç dönemde FSGS bağımlı nefrotik sendrom tablosuna neden olmaktadır.(60,94,95)

Matsui ve ark.(96) 10mg/100gr tek doz intravenöz püromisin aminonükleoziti vererek nefrotik sendrom oluşturmuşlar, deney bitiminde hem idrar hem de böbrekten alınan dokular histopatolojik ve rna transkripsiyonu açısından incelenmişlerdir. Bu çalışmada püromisin verildikten sonra 4.günde protein/kreatinin oranında artış gözlenmiştir.

Muroya ve ark.(97) 100mg/kg tek doz intravenöz püromisin aminonükleoziti vererek nefrotik sendrom oluşturmuştur. 14.günde örnek toplanması yapılmış ve nefrotik sendrom geliştirilmiştir. Nefrotik sendromun ilk günlerde olduğu gösterilmiş sonrasında ise tedavi başlanmıştır.

Özkan ve arkadaşlarının(111) yaptığı çalışmada nefrotik sendrom doksarubisin ile sağlanmıştır. Proteinüri 4-5.günde başlamasına rağmen nefrotik proteinüri 13-15.günde gelişmiştir. Az sayıda hayvanla çalışacağından uzun süreli yaşam sağlanması hayvanların bakım işlemleri ve tedavi süreçleri uzun olacağından nefrotik sendromun PAN ile geliştirilmesi tercih edilmiştir.

5.3. Proteinüri Etkisi

Nefrotik sendromda protein/kreatinin oranının 2 ve üstünde olması tanı için anlamlı bulunmaktadır. Tanı kriterleri arasında yer almaktadır. Nefrotik sendromda proteinüri artarken, bu proteinüriye bir çok problem eşlik etmektedir.(130-135)Çalışmamızda şıçanların proteinüri geliştirmesi için PAN kullanılmıştır. Protein/ kreatinin oranları için çalıştırılan spot idrarlar ise özel bir labaratuarda çalışılmıştır. Bu nedenle sonuçlar elimize geç ulaşmıştır. Grupların ilk gün spot idrarda protein/keatinin oranları değerlendirildiğinde gruplar arasında fark saptanmıştır. D vitamini grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmıştır.(p 0,003). D vitamini grubu ile nefrotik sendrom grubu arasında anlamlı farklılık saptanmıştır.(p= 0.020). D vitamini grubunun medianı 1.00(0,70-1,40), kontrol grubunun medianı 1,75(1,40-1,90), nefrotik sendrom grubunun medianı 1,80(1,50-1,90) ve parikalsitol grubunun medianı 1,25(0,90-1,60) olarak bulunmuştur. 0. Günde grupların kendi aralarında anlamlılık olması sonrasında yapılan istatistiklerde GLM yapıldığında interaction oluşmasına neden olmuştur. Eğer 0.gün idrar protein ve kreatin değerleri erken elimize ulaşmış olsaydı, gruplar arasında protein/kreatinin

oranları açısından eşitleme sağlanabilirdi. Bu eşitleme sağlansaydı, sonraki günlerde alınan idrar örneklerinin gruplar arasında karşılaştırılmalarında klinik ve istatistiksel anlamlılık elde etme oranı artabilirdi. İlaçların etkisi açısından da değerlendirmek daha sağlıklı olabilirdi. Bu yüzden yapılan istatistiklerde zorluk yaşanmıştır. Fakat gruplar kendi içinde günler açısından değerlendirildiğinde sorun olmamaktadır.

Nefrotik sendrom grubunda 4. Günde protein / kreatinin oranı proteinüri açısından anlamlı seviyeye ulaşmış ve sonrasında da devam etmiştir. Fakat 0.gün ile 4.gün arasında anlamlılık sağlanmış iken 4.gün ile 7.gün arasında bir anlamlılık yoktur. Matsui ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da PAN grubunda 4.günde protein/ kreatinin oranında anlamlı olacak düzeyde proteinüri saptanmıştır.(96). Spot idrarda protein/kreatinin oranları arasında yapılan istatistikte rakamsal farklılıklar saptanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Fakat klinikle tam korelasyonu yoktur. D vitamini ve parikalsitol grubunun idrar analizleri arasında tedavisel fark saptanmamıştır. D vitaminin ve parikalsitolin proteinüri üzerine etkisi saptanamamış ve ayrıca birbiri üzerine bir üstünlüğü saptanamamıştır. Bu durum grupların başlangıç proteinüri değerlerinin birbirinden farklı başlanması nedeniyle anlamsızlık oluşturduğu düşünülmüştür. Başta randomizasyon tekrarlanırsa idi belki anlamlılık sağlanabilirdi.

Proteinüriyi azalttığı ispatlanmış tedavilerin yanında hala çalışılmakta olan ilaçlar mevcuttur. Nefrotik sendromlarda steroid ve immünsüprese tedavilerin proteinüriyi azalttığını biliyoruz. Ayrıca ACE inhibitörleri ve VDR aktivatörlerinin de proteinüriyi azalttığı gösterilmiş(112). D vitamin analogları ile yapılan çalışmalarda da proteinüriyi azaltma etkisi gösterilmiştir. (96). Ne kadar çalışmamızda parikalsitolün etkisini gösterememiş olsakta parikalsitolün etkisi metabolizması açısından etkili olma olasılığı yüksektir ve ek çalışmalar yapılması gerekmektedir.

5.4. D Vitamini ve Parikalsitol Etkisi

Kronik böbrek yetmezliği olan kişilerde 1,25(OH)₂D₃ eksikliği, proksimal tübüler epitel hücrelerindeki yetersizlik 1 (OH)²laza bağlı hastalıkların erken

döneminde görülür(100-102). PAN nefrit indüksiyonunun proksimal tübüler epitel hücrelerinde 1α (OH) lazı neden azalttığı kesin olarak bilinmemekle birlikte, reaktif oksijen metabolitleri PAN nefritinde önemli mediatörler olduğundan oksidatif stress buna neden olabilir ve reaktif oksijen metabolitleri ayrıca 1α (OH)laz aktivitesini etkileyebilirler (103-105). Slit diyaframın önemli bir bileşeni olan nefrin'in bariyer fonksiyonunu sürdürmede anahtar bir molekül olduğu bilinmektedir (106-108). Bozulmuş nefrin ekspresyonu proteinürüye tetikler ve nefrinin ekspresyonunun düzelmesi proteinürinin azalmasına neden olur. Matsui ve ark yaptığı çalışmada, PAN nefriti modelinde, 1α , 25 (OH) 2 D3 veya 22-oksakalsitriol ile tedavi vererek nefrin ekspresyonunu geri kazandırmıştır. Bu çalışmada proteinürinin azalması nefrin ekspresyonunun düzelmesi ile açıklanmıştır. Kitamura ve ark. aktif D vitamininin direkt olarak podositlerdeki VDR'ye bağlandığını ve ekilmiş fare podositlerinde nefrin mRNA'sının transkripsiyonunu arttırdığını göstermiştir(109-110). Dahası 1α , 25 (OH) 2D3 ve ATRA ile ilave tedavilerde eş zamanlı olarak nefrin gen ekspresyonunun upregülasyonuna yol açmıştır.(109-110). Matsui ve ark yaptığı çalışmada 1,25(OH)2D3 ve 22-oksikalsitol verilen ratlarda nefrin mRNA ekspresyon artışı saptanmıştır(96). Çalışmamızda 1,25(OH)2D3 verilen grupta kontrol ve nefrotik sendrom grubuna göre rakamsal olarak nefrin mRNA ekspresyon artışı olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık yaratacak bir artış bulunamamıştır. Wang ve ark. yaptığı çalışmada deneysel nefrotik sendrom geliştirilen ratlarda hem podosin hemde nefrin mRNA ekspresyonunda azalma anlamlı olarak saptanmıştır(99). Çalışmamızda nefrin mRNA ekspresyonunda rakamsal olarak nefrotik grupta azalma saptanamamıştır. Podosin mRNA da ise rakamsal farklılık olmasına rağmen istatistiksel bir farklılık bulunmamaktadır. Yapılan derlemede çalışmalarda parikalsitolün proteinüri üzerine azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir.(148-149) Fakat nefrotik sendrom düzeyindeki proteinürilerde mRNA üzerinden etkisi olup olmadığı çalışılmamıştır(99). Çalışmamızda parikalsitol verilen grubun podosin ve nefrin mRNA etkisine bakılmıştır. Nefrin mRNA ekspresyonunda rakamsal anlamlı ekspresyon artışı mevcut fakat istatistiksel anlamlılık yoktur.(p =0,721). Podosin mRNA ekspresyonunda ise parikalsitol verilen

grubun nefrotik sendrom geliştirilen gruba göre mRNA ekspresyon artışı hem rakamsal hemde istatistiksel olarak anlamlıdır. ($p=0,003$). Öncesinde parikalsitolün proteinüri üzerine etkisinde mRNA üzerindeki etki açısından değerlendirilmemiştir. Yaptığımız çalışma ile parikalsitol mRNA ekspresyonu açısından daha fazla çalışma yapılmasına öncülük edecektir.

Gruplardan alınan histolojik kesitlerin hematoksilen ve eozin boyaması sonuçları değerlendirildiğinde hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubunda normal glomerül yapısı gözlenir iken PAN uygulaması ile oluşturulan nefrotik sendrom modelinde normal glomerül yapısına yakın sadece hipersellülarite gözlenmiş olup literatürle uyumlu olduğu gözlenmiştir (96,113,146). D vitamini ve parikalsitol uygulanan gruplarda ışık mikroskobu ile değerlendirildiğinde normal glomerül yapısı izlenmiştir. Ayaksı çıkıntıların daha ayrıntılı değerlendirilmesi için elektron mikroskobu ile değerlendirme uygun olacaktır.(114,147)

Grupların immunohistokimyasal sonuçları değerlendirildiğinde ise; kontrol grubunda normal glomerül yapısında nefrin ve podosinin orta şiddette immunoreaktivitesi izlenir iken PAN uygulanan grupta hem nefrin hem de podosin immunoreaktivitelerinin azalması nefrotik sendrom modelinin oluşturulduğunu göstermiştir. PAN ile D vitamini ve parikalsitol uygulanan gruplarda nefrin immunoreaktivitesinin kontrol grubuna benzer şekilde olduğu fakat podosin immunoreaktivitesinin ise nefrin immunoreaktivitesine göre daha az olduğu izlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, uygulanan tedavilerin daha çok nefrin üzerinden etkili olduğu, podosini etkilemediği düşünülmüştür. Fakat istatistiksel olarak anlamlılığa bakıldığında ise ne nefrin ($p = 0,475$) ne de podosin($p=0,356$) immünreaktivasyon açısından anlamlı farklılık sağlanamamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda amaçladığımız sonuçlara ulaşılmasada parikalsitolün proteinüri ve nefrotik sendromun histolojik ve nefrin/podosin mRNA üzerine olan etkisinin D vitamini kadar değerli olabileceği yönünde işaretler içermektedir. Bu nedenle ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

VI.SONUÇLAR

1. Kontrol grubunun 0.gün [median 1,75(1,40-1,90)], 4.gün [median 1,75(1,40-2,00)] ve 7.gün [medianı 1,65(1,40-2,00)] protein/kreatinin oranı kendi aralarında karşılaştırıldıklarında rakamsal ya da istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır (p = 0,957).
2. Nefrotik sendrom grubunun 0.gün [median 1,80(1,50-1,90)], 4.gün [median 2,15(2,00-2,40)] ve 7.gün [median 2,15(1,80-2,50)] protein/kreatinin oranları arasında anlamlı fark bulunmaktadır(p = 0015).
3. Nefrotik sendrom grubunun 0.gün protein/ kreatinin oranı 7.gün protein/kreatinin oranından rakamsal olarak düşük bulunmakla beraber istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır(p = 0,13).
4. Nefrotik sendrom grubunun 0.gün ve 4.gün protein/kreatinin oranı arasında rakamsal olarak 4.gün, 0.günden fazladır ve istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır (p = 0,018).
5. Nefrotik sendrom grubunun 4.gün ve 7.gün protein/kreatinin oranı arasında rakamsal ve istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır(p = 1,0).
6. D vitamini grubunda 0.gün[median 1,00 (0,70-1,40)], 4.gün [median 1,45(1,20-1,80)]ve 7.gün[median 1,85(1,60-2,20)] protein kreatinin oranları arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmıştır(p = 0,030) .
7. D vitamini grubunda 0.gün ve 4.gün proteinin kreatinin oranı arasında rakamsal olarak fark oluşmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır (p = 0,25).
8. D vitamini grubunda 0.gün protein/ kreatinin oranı 7.gün protein kreatinin oranından rakamsal olarak düşük saptanmıştır. Fakat istatistiksel anlamlı farklılık saptanmıştır(p = 0,028).
9. D vitamini grubunda 4.gün protein/kreatinin oranı 7.gün protein kreatinin oranından rakamsal olarak düşük olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır (p = 1,000).
10. Parikalsitol grubunun 0.gün[median 1,25(0,90-1,60)], 4.gün[median 1,40(1,10-1,80)] ve 7.gün [median 1,90(1,70-2,30)] protein kreatinin oranı arasında rakamsal ve istatistiksel anlamlı farklılık saptanmıştır(p = 0,080).

11. Parikalsitol grubunun 4.gün protein/kreatinin oranı 0.gün protein/kreatinin oranından rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır($p = 0,582$).
12. Parikalsitol grubunda 7.gün protein/kreatinin oranı 0.gün protein/kreatinin oranından rakamsal olarak fazla saptanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır. ($P = 0,007$)
13. Parikalsitol grubunda 7.gün protein/kreatinin oranı, 4.gün protein/kreatinin oranından rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır($p = 0,250$).
14. 0.gün idrarlarında kontrol[median 1,75(1,40-1,90)], nefrotik sendrom[median 1,80(1,50-1,90)], D vitamini [median 1,00(0,70-1,40)]ve parikalsitol[median 1,25(0,90-1,60)] gruplarının protein kreatinin oranları karşılaştırıldığında rakamsal farklılık ve istatistiksel anlamlılık sağlanmıştır($p = 0,028$).
15. 0.gün idrarlarında kontrol grubunun protein/kreatinin oranı nefrotik sendrom grubunun protein kreatinin oranından rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık sağlanamamıştır($p = 1,000$).
16. 0.gün idrarlarında nefrotik sendrom grubunun protein/kreatinin oranı parikalsitol grubunun protein/kreatinin oranından rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır ($p = 0,474$).
17. 0.gün idrarlarında kontrol grubunun protein/kreatinin oranı parikalsitol grubunun protein/kreatinin oranından rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır($p = 0,474$).
18. 0.gün idrarlarında nefrotik sendrom grubunun protein /kreatinin oranı D vitamini grubunun protein /kreatinin oranı arasında rakamsal farklılık sağlanmış ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p = 0,003$).
19. 0.gün idrarlarında kontrol grubunun protein/kreatinin oranı D vitamini grubunun protein/kreatinin oranı arasında rakamsal farklılık sağlanmış ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p = 0,020$).
20. 0.gün idrarlarında parikalsitol grubunun protein kreatin oranı D vitamini grubunun protein kreatinin oranından rakamsal olarak fazla olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır($p = 1,000$).

- 21.4.gün protein kreatin oranları kontrol, nefrotik sendrom, D vitamini ve parikalsitol grupları arasında karşılaştırmaları yapılmıştır. Bu karşılaştırmada anlamlı istatistiksel farklılık saptanmıştır($p = 0,010$).
- 22.4.gün idrarlarında nefrotik sendrom grubunun protein kreatinin oranı kontrol grubunun protein kreatinin oranından rakamsal olarak fazladır ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.($p = 0,020$).
- 23.4.gün idrarlarında nefrotik sendrom grubunun protein kreatinin oranı D vitamini grubuna göre rakamsal olarak fazladır ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.($p = 0,003$).
- 24.4.gün idrarlarında kontrol grubunun protein kreatinin oranı D vitamin grubunun protein kreatinin oranına göre rakamsal olarak yüksek olsada istatistiksel olarak anlamlılık sağlanamamıştır($p = 1,000$).
- 25.4.gün idrarlarında nefrotik sendrom grubunun protein kreatin oranı parikalsitol grubuna göre rakamsal olarak fazladır ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p = 0,003$).
- 26.4.gün idrarlarında kontrol grubunun protein kreatinin oranı parikalsitol grubuna göre rakamsal olarak fazla olsada istatistiksel anlamlılık sağlanmamıştır($p = 1,000$).
- 27.4.gün idrarlarında D vitamini grubunun protein kreatinin oranı parikalsitol grubuna göre rakamsal olarak fazla olsada istatistiksel anlamlılık sağlanamamıştır($p = 1,000$).
28. Kontrol[median 1,65(1,40-2,00)], nefrotik sendrom[median 2,15(1,80-2,50)] , D vitamini[median 1,85(1,60-2,00)] ve parikalsitol[median 1,90(1,70-2,30)] grupları 7.gün protein/kreatinin oranı açısından değerlendirildi. Gruplar arasında rakamsal farklılık olmasına rağmen anlamlı istatistiksel fark saptanamamıştır ($p = 0,337$).
29. PAN grubunun kontrol grubundan nefrin mRNA ekspresyon farkında artış bulundu[median 24,41ct(22,94-25,30)ve24,24ct(23,48-26,11)]. Fakat aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.($p = 0,721$)
30. PAN grubunun kontrol grubundan podosin mRNA ekspresyon farkında azalma bulundu[median 26,06ct(21,81-22,06)ve22,48ct(21,89-22,97)]. Fakat aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.($p = 1,0$)

- 31.D vitamini grubunun kontrol grubundan nefrin mRNA ekspresyon farkında artış bulundu[median 24,40ct (22,77-25,14)ve24,24ct(23,48-26,11)]. Fakat aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.(p = 0,721)
- 32.D vitamini grubunun kontrol grubundan podosin mRNA ekspresyon farkında azalma bulundu[median 22,07ct (21,91-22,54) ve22,48ct(21,89-22,97)]. Fakat aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.(p = 0,474)
- 33.D vitamini grubunun nefrotik sendrom grubundan nefrin mRNA ekspresyon farkında artış bulundu[median 24,40ct (22,77-25,14) ve24,24ct(23,48-26,11)]. Fakat aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.(p = 0,721)
- 34.D vitamini grubunun nefrotik sendrom grubundan podosin mRNA ekspresyon farkında artış bulundu.[median 27,07ct (21,91-22,54) ve22,06ct(21,81-22,06)]. Fakat aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.(p = 1,0)
- 35.D vitamini grubunun parikalsitol grubundan nefrin mRNA ekspresyon farkında azalma bulundu.[median 24,40ct (22,77-25,14) ve25,06ct(24,07-26,42)]. Fakat aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.(p= 0,721)
- 36.D vitamini grubunun parikalsitol grubundan podosin mRNA ekspresyon farkında artış bulundu.[median 27,07ct (21,91-22,54) ve22,55ct(22,42-23,02)]. Fakat aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.(p = 1,0)
- 37.Parikalsitol grubunun kontrol grubundan nefrin mRNA ekspresyon farkında artış bulundu.[median 25,06ct(24,07-26,42) ve 24,24ct(23,48-26,11)]. Fakat aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.(p = 0,721)
- 38.Parikalsitol grubunun kontrol grubundan podosin mRNA ekspresyon farkında artış bulundu.[median 22,55ct(22,42-23,02) ve 22,48ct(21,89-22,97)]. Fakat aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.(p = 1,0)
- 39.Parikalsitol grubunun nefrotik sendrom grubundan nefrin mRNA ekspresyon farkında artış bulundu.[median 25,06ct(24,07-26,42) ve 24,41ct(22,94-25,30)]. Fakat aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı.(p= 0,721)
- 40.Parikalsitol grubunun nefrotik sendrom grubundan podosin mRNA ekspresyon farkında artış bulundu.[median 22,55ct(22,42-23,02) ve

22,06ct(21,81-22,06)]. Aralarında anlamlı istatistiksel farklılık saptanmıştır.(p = 0,003)

- 41.Yapılan hematoksilen eozin boyamada kontrol grubunun renal histolojisinin normal olduğu izlendi.
- 42.Nefrotik sendrom (PAN)grubunda glomerülde hipersellülarite olduğu görüldü.
- 43.D vitamini uygulanan gruplarda ise hipersellülaritenin minimal olduğu saptandı
- 44.Parikalsitol uygulanan gruplarda ise hipersellülaritenin minimal olduğu saptandı.
- 45.Kontrol grubunda, nefrin immunoreaktivitesinin orta (2), podosin immunoreaktivitesinin ise hafif yer yer orta şiddette (1/2) glomerüllerde kapiller etrafında olduğu izlendi.
- 46.Nefrotik sendrom(PAN) grubunda, nefrin ve podosin immunreaktivitelerinin hafif (1) olduğu gözlendi.
- 47.PAN ve D vitamini uygulanan grupta, nefrin immunreaktivitesinin orta (2), podosin immunoreaktivitesinin ise hafif (1) şiddette olduğu saptandı.
- 48.PAN ve parikalsitol uygulanan grupta, nefrin immunreaktivitesinin orta (2), podosin immunoreaktivitesinin ise hafif (1) şiddette olduğu saptandı.
- 49.Tüm gruplarda podosin immünreaktivitesi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır(p= 0,356).
- 50.Tüm gruplarda nefrin immünreaktivitesi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır(p= 0,475).

VII.ÖZET

PÜROMİSİN (PAN) İLE NEFROTİK SENDROM GELİŞTİRİLEN RATLARDA 1,25(OH)₂ VİTAMİN D₃ VE PARİKALSİTOLÜN PROTEİNÜRİ İLE PODOSİN VE NEFRİN MRNA ÜZERİNE ETKİSİ

Amaç: Nefrotik sendrom çocukluk çağının sonrasında ciddi morbiditelere yol açabilen bir hastalıktır. Steroid tedavisinden başlayarak immünsüpresanlara kadar birçok tedavi prosedürü kullanılmaktadır. Birçok ilacında antiproteinürik ve renoprotektif etkisi denenmektedir. Çalışmamızda 1,25(OH)₂D₃ vitamini ve parikalstolün proteinüri, böbrek doku histolojisi, podosin ve nefrin mrna üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Yöntem: 28 sıçan 4 gruba ayrıldı. Deneysel nefrotik sendrom 10mg/100gr püromisin ile sağlandı. Grup 1 sağlam kontrol grubu, Grup 2 PAN ile oluşturulmuş nefrotik sendrom grubu, Grup 3 D vitamini grubu, Grup 4 parikalsitol grubu olarak belirlenmiştir. Grup 1'e herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamıştır. Grup 2' ye sadece püromisin uygulaması yapılmıştır. Grup 3 'e, püromisin uygulaması yapıldıktan sonra 7 gün boyunca hergün intra peritoneal olarak 0,4 µg/kg/gün dozunda 1,25 (OH)₂ D₃ uygulaması yapıldı. Grup 4'e püromisin uygulaması yapıldıktan sonra 7 gün boyunca hergün intraperitoneal olarak 240ng/kg/gün dozunda parikalsitol uygulaması yapıldı.0,4. ve 7. günlerde masaj yapılarak spot idrar örnekleri toplandı. 7 gün sonrasında sıçanlardan böbrek doku örnekleri alındıktan sonra sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

Bulgular: idrar protein/kreatinin oranının nefrotik sendrom grubunun kendi içerisindeki artışı anlamlı bulunmuştur(p=0.015). Ayrıca parikalsitol ve d vitamini gruplarında da protein/kreatinin oranın günler içerisinde artışı anlamlıdır. (p=0,008,p:0,030). Fakat gruplar arasında karşılaştırıldığında 0.gün idrar protein/kreatinin oranları arasında istatistiksel anlamlı farklılık oluşu (p=0,028) sonraki günlerdeki gruplar arasındaki karşılaştırmayı anlamsız kılmaktadır. Nefrin mRNA ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı farklılık saptanamamıştır.(p=0,721). Podosin mRNA ekspresyonunda, parikalsitol

grubunda nefrotik sendrom grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır($p= 0,003$). Yapılan histolojik incelemelerde nefrotik sendrom grubunda glomerüler hipersellülerite saptanmıştır. Parikalsitol ve d vitamini grubunda ise minimal glomerüler hipersellülerite saptanmıştır. Fakat podosin ve nefrin için yapılan immünhistokimyasal incelemelerde anlamlı immünreaktivasyon saptanamamıştır.($p= 0,356$, $p= 0,475$).

Sonuç: Sonuç olarak parikalsitol ve D vitamini ile yapılan çalışmalar ve teorik bilgiler ışığında antiproteinürik ve renoprotektif etkileri olduğunu bilmekteyiz. Yaptığımız çalışmada rakamsal olarak bu etkiyi gözlemlemiş olmamıza rağmen istatistiksel anlamlılık sağlanamamıştır.

Anahtar kelimeler: Nefrotik sendrom, Parikalsitol, D vitamini, Nefrin, Podosin, Proteinüri

VIII.ABSTRACT

USING 1,25(OH)₂ VITAMIN D₃ AND PARICALCITOL IN RATS, IN WHICH THE NEPHROTIC SYNDROME IS INDUCED BY PUROMYCIN (PAN), IT WAS EFFECT OF THE LEVEL OF PROTEINURIA, PODOCIN AND NEPHRIN MRNA WITH PCR.

Puprose: Nephrotic syndrome is a disease that may give rise to the serious morbidities after childhood period. Several treatment procedures are used, from steroid treatment to immunosuppressants. Antiproteinuric and renoprotective effects are tried in several medicines. In our study, we aimed to investigate the effect of 1,25 (OH) ₂D₃ vitamin and paricalcitol proteinuria, renal tissue histology, podocin and nephrin upon mRNA.

Materials and Methods: 28 number of rats has been divided into 4 groups. Experimental nephrotic syndrome has been provided with 10mg/100gr of puromycin. Group 1 has been determined as a healthy control group, Group 2 as a nephrotic syndrome group formed by PAN, Group 3 as a vitamin D group, Group 4 as a paricalcitol group. No medication has been realized to Group 1. Only puromycin application has been performed to Group 2. 1,25 (OH) ₂D₃ application has been realized intraperitoneally to Group 3 in dose of 0,4 µg/kg/day every day for 7 days after performing the application of puromycin. Paricalcitol application has been realized intraperitoneally to Group 4 in dose of 240ng/kg/day every day for 7 days after performing the application of puromycin. Spot urine samples have been collected after performing massaged on the 0th, 4th and 7th days. After taking renal tissue from the rats after 7 days, rats have been sacrificed by cervical dislocation method.

Results: An increase of urine protein/creatinine ratio in nephrotic syndrome within itself has been found significant (p=0.015). In addition, increase of protein/creatinine within days is significant also in groups of paricalcitol and vitamin D (p=0,008,p:0,030). However, when compared between groups, the presence of a statistically-significant difference between urine protein/creatinine ratio on 0th day makes the comparison between the groups meaningless in the following days (p=0,028). No significant difference could have been detected between the groups in mRNA expression of nephrin

($p=0,721$). In mRNA expression of podocin, no statistically significant increase has been detected according to the nephrotic syndrome group ($p = 0.003$). Glomerular hypersolarity has been found out in the nephrotic syndrome group in performed histological studies. And minimal glomerular hypersolarity has been detected in paricalcitol and vitamin D group. However, no significant immunoreactivity could have been detected in the immunohistochemical studies realized for podocin and nephrin ($p= 0,356$, $p= 0,475$).

Conclusion: As a result, under the light of the studies which have been performed with paricalcitol and Vitamin D and theoretical information, we are aware that there are antiproteinuric and renoprotective effects. Although we have observed numerically this effect in the study that we have carried out, statistical significance has been achieved.

Key words: Nephrotic syndrome, Paricalcitol, Vitamin D, Nephrin , Podocin, Proteinuri

IX. KAYNAKLAR

1. Prof.Dr.Nihal İçten, Üriner Sistem Anatomisi,. Sistematik Anatomi (Ed. Prof.Dr.Figen Gövsa Gökmen), Güven Kitap Evi, İzmir, 2003:531-545
2. Yıldırım Mehmet, İnsan Anatomisi, Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul, 1999.
3. Ferner H, Staubesand J., Sobotto Atlas Of Human Anatomy, 13th Ed. Münih, Urban & Schwarzenberg, 2001.
4. Gartner, L.P., Hiatt, J.L., Color Textbook of Histology, Third Ed., Saunders, 2007.
5. Ross, M.H., Pawlina, W., Histology A Text and Atlas, Lippincott Williams and Wilkins, 5. Ed., Baltimore, 2006.
6. Kierszenbaum, A. L., (Çeviri Edit: Ramazan Demir), Histoloji ve Hücre Biyolojisi- Patolojiye Giriş-, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.
7. Junqueira, L.C., Carneiro, j., (Çeviri Edit: Yener Aytekin), Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006.
8. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. Text/Atlas of Histology. Canada: WB Saunders Co. 1988.
9. Spring-Mills, E.J., Microscopic Anatomy , part 2, Suny Health Science Center-Department of Anatomy and Cell Biology State University of New York, 1992.
10. Paker Ş. Histoloji. 2.baskı. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi. 1993.
11. Tanyolaç, A., Özel Histoloji, Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd. Şti., Ankara, 1999.
12. Oner G, Böbreklerde idrar oluşumu: Glomerüler filtrasyon, böbrek kan akımı ve kontrolü. In Tibbi fizyoloji, Guyton AC, Hall JE (eds),11th ed. Ankara, Nobel Tıp, 2007, s 307-347.
13. Karabıyık L, İnan G, Renal Fizyoloji ve Anestezi, Bölüm 24, Temel Anestezi, Keçik Y (ed), Ankara, Güneş Tıp Kitapevle-ri Ltd Şti, 2012, s 319-340.
14. Teltik Başar H, Özcan NN, Renal hastalıklar ve anestezi. Organ Sistemleri ve Anestezi. Teltik Başar H, Baltacı B, Kay-mak Ç (eds). Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri Ltd Şti, 2010, s 107-123.

15. Holmberg C, Tryggvason K, Kestila MK, Jalanko HJ. Glomerular disease. In: *Pediatric Nephrology*, Avner E, Eds. 5th Ed, New York:Lippincott Williams and Wilkins, 2004:501–664.
16. Eddy AA, Symsons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*, 2003;362:629–639.
17. Valantini RP, Smoyer WE. Nephrotic syndrome. In: *Clinical Pediatric Nephrology*, Kher KK Eds. 2 nd Edition, New York: McGraw-Hill Inc, 2007: 155-94.
18. Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int* (1978) 13(2):159–65. doi:10.1038/ki.1978.23
19. International Study of Kidney Disease in Children. Nephrotic syndrome in children: prediction of histology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. *Kidney Int*, 1978;13(2):159–165.
20. Salcedo JR, Thabet MA, Latta K, Chan JC. Nephrosis in childhood. *Nephron*, 1995;71(4):373–385.
21. Oskan N, Ozer A,Koc M, Cetinel S, Histomorphological Changes of Apelin Treatment in Renal Tissue inDoxorubicin-induced Nephrotic Syndrome Model,*Clinical and Experimental Health Sciences*,2016;6(1):20-7
22. Valentini RP, Smoyer WE. Nephrotic syndrome. In: *Clinical Pediatric Nephrology*, Kher KK, Schnaper HW, Makker SP Eds. 2nd Ed, London: Informa UK Ltd, 2007:155–194
23. Robins pataoloji,
24. Chesney R. The changing face of childhod nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 2004;66:1294–1302
25. Martin AN, Edelmann CM, Berstein J, Barnett H. The nephrotic syndrome. In: *Pediatric Kidney Disease*, Edelmann CM Eds. 2nd Ed, Boston: Little Brown and Company, 1992:1274–1290

26. Austin HA, Antonovych TT, MacKay K, Boumpas DT, Balow JE. Membranous nephropathy. *Ann Intern Med*, 1992;116(8):672–682.
27. Salcedo JR, Thabet MA, Latta K, Chan JC. Nephrosis in childhood. *Nephron*, 1995;71(4):373–385.
28. Kim JS, Bellew CA, Silverstein DM, Aviles DH, Boineau FG, Vehaskari VM. High incidence of initial and late steroid resistance in childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2005; 68: 1275–1281.
29. McBryde KD, Kershaw DB, Smoyer WE. Pediatric steroid resistant nephrotic syndrome. *Curr Probl Pediatr* 2001; 31: 275–307.
30. Robert M. Kliengman, Bonita F. Stanton, Joseph W. St. Geme et al. Nelson Pediatrics, 19-2015, 2nd ed. 1799-1804
31. Sinha A., Bagga A, nephrotic Syndrome, Indian J pediatr august 2012, 79(8): 1045-1055
32. Kaysen GA, Gambertoglio J, Felts J, Hutchinson FN. Albumin synthesis, albuminuria and hyperlipidemia in nephrotic patients. *Kidney Int*, 1987;31:1368–1376
33. Lewis DM, Tooke JE, Beaman M, Gamble J, Shore AC. Peripheral microvascular parameters in the nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 1998;54:1261-1266.
34. Thabet MA, Salcedo JR, Chan JC. Hyperlipidemia in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 1993;7(5):559–566.
35. Appel G. Lipid abnormalities in renal disease. *Kidney Int*, 1991;39(1):169–183.
36. Löwik MM, Groenen PJ, Levtchenko EN, Monnens LA, van den Heuvel LP. Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis-A review. *Eur J Pediatr*. 2009;168:1291–304.
37. Araya CE, Wasserfall CH, Brusko TM, et al. A case of unfulfilled expectations. Cytokines in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2006;21:603–10.
38. Zhang SY, Audard V, Fan Q, Pawlak A, Lang P, Sahali D. Immunopathogenesis of Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Contrib Nephrol*. 2011;169:94–106.

39. Taylor PA, Lees CJ, Fournier S, Allison JP, Sharpe AH, Blazar BR. B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions. *J Immunol.* 2004;172:34–9.
40. Gulati S, Sharma AP, Sharma RK, Gupta A, Gupta RK. Do current recommendations for kidney biopsy in nephrotic syndrome need modifications? *Pediatr Nephrol*, 2002;17(6):404–08.
41. Bagga A, Hari P, Srivastava RN. Prolonged versus standard prednisolone therapy for initial episode of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 1999;13(9):824–827.
42. Ekka BK, Bagga A, Srivastava RN. Single- versus divided-dose prednisolone therapy for relapses of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 1997;11(5):597–599.
43. Filler G. Treatment of nephrotic syndrome in children and controlled trials. *Nephrol Dial Transplant*, 2003;18(16):75–78.
44. Yorgin PD, Krasher J, Al-Uzri AY. Pulse methylprednisolone treatment of idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2001;16(3):245-250.
45. Kalkan S. Steroide yanıtılı nefrotik sendromlu çocuklarda tedavi yaklaşımları Treatment approaches in children with steroid sensitive nephrotic syndrome , 2011; 38 (3): 361-367 Dicle Medical Journal doi: 10.5798/diclemedj.0921.2011.03.0051
46. Öner A, Demircin G, Bülbül G, Çocukluk Çağı İdiopatik Nefrotik Sendromlarında Relapslara Etki Eden Faktörler Ve Prognoz Üzerine Etkisi The Factors That Affect The Relapses And Their Prognostic Significance In Childhood Idiopathic Nephrotic Syndrome , Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*Official Journal of the Turkish Nephrology Association 1995; 2: 80-85
47. Davison AM. Steroid therapy in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant (Suppl.)* 1990; 1: 23- 28.
48. Haws RM, Baum M. Efficacy of albumin and diuretic therapy in children with nephrotic syndrome. *Pediatrics* 1993;91:1142-1146.

49. Yoshimura A, Ideura T, Iwasaki S, Taira T, Koshikawa S. Aggravation of minimal changes nephrotic syndrome by administration of human albumin. *Clin Nephrol* 1992;37:109-114.
50. Report of Arbeitsgemeinschaft für Padiatrische Nephrologie. Cyclophosphamide treatment of steroid dependent nephrotic syndrome: comparison of eight week with 12 week course. *Arch Dis Child*, 1987;62(11):1102–1106.
51. Thabet MA, Salcedo JR, Chan JC. Hyperlipidemia in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 1993;7(5):559–566.
52. Callis L, Nieto J, Vila A, Rende J. Chlorambucil treatment in minimal lesion nephrotic syndrome: a reappraisal of its gonadal toxicity. *J Pediatr*, 1980;97(4):653-656.
53. Fu LS, Shien CY, Chi CS. Levamisole in steroid-sensitive nephrotic syndrome children with frequent relapses and/or steroid dependency: comparison of daily and every-other-day usage. *Nephron Clin Pract*, 2004;97:137–141.
54. Meyrier A. Treatment of idiopathic nephrotic syndrome with cyclosporine A. *J Nephrol*, 1997;10(1):14–24.
55. Loeffler K, Gowrishankar M, Yui V. Tacrolimus therapy in pediatric patients with treatment-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2004;19:281–287.
56. Schweda F, Liebl R, Riegger GA, Kramer BK. Tacrolimus treatment for steroid- and cyclosporin- resistant minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 1997;12:2433–2435.
57. Briggs WA, Choi MJ, Scheel PJ. Successful mycophenolate mofetil treatment of glomerular disease. *Am J Kidney Dis*, 1998;31:213–217.
58. Cartwright ME, Jaenke RS. Effects of dietary protein and captopril on glomerular permselectivity in rats with unilateral nephrectomy. *Lab Invest*, 1988;59(4):492–499.
59. Remuzzi A, Puntorieri S, Battaglia C, Bertani T, Remuzzi G. Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular

- filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat. *J Clin Invest*, 1990;85(2):541–549.
60. Bohrer MP, Baylis C, Robertson CR, Brenner BM, Troy JL, Willis WT. Mechanisms of the puromycin-induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. *J Clin. Invest*, 1977;60(1):152–161.
 61. Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int*, 1975;8(5):219–232.
 62. Franco R, Gut A, Ferrari-Spadotto A, Georgette J, Gavras I, Gavras H. Pressor mechanisms in adriamycin-induced nephropathy with hypertension in rats. *Hypertension*, 1994;23(1):1246-1249.
 63. Weening JJ, Rennke HG. Glomerular permeability and polyanion in adriamycin nephrosis in the rat. *Kidney Int*, 1983;24(2):152–159.
 64. Whiteside C, Prutis K, Cameron R, Thompson J. Glomerular epithelial detachment, not reduced charge density, correlates with proteinuria in adriamycin and puromycin nephrosis. *Lab Invest*, 1989;61:650-660.
 65. Futenma A, Miyai H, Iida T, Hara T, Watanabe T, Shiono S, Fukatsu A, Kato K. The protective effect of probucol on adriamycin nephrosis in the rat. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, 1995;37(11):616–621.
 66. Remuzzi G, Bertani T. Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int*, 1990;38(3):384–394..
 67. Bertani T, Remuzzi G, Poggi A, Delaini F, Sacchi G, Morassi L, Verroust P, Mecca G, Donati MB. Severe glomerular epithelial cell damage does not prevent passive Heyman nephritis in rats. *Clin Exp Immunol*, 1983;51(1):38–44.
 68. Couser WG, Steinmuller DR, Stilmant MM, Salant DJ, Lowenstein LM. Experimental glomerulonephritis in the isolated perfused rat kidney. *J Clin Invest*, 1978;62(6):1275–1287.
 69. Chesney WR. Rickets: An old form for a new century. *Pediatrics International*. 2003; 45: 509-11.

70. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL et al. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet* 1982; 1:74-76.
71. Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ et al. Absence of seasonal variation in serum concentration of 1,25(OH) dihydroxyvitamin D despite a rise in 25 OH vitamin D in summer. *J Clin Endokrinol Metab* 1981; 53: 139-42.
72. Yurdakök M. Doğa ve İnsan Tarihinde Vitamin D. *Katkı Pediatri Dergisi* 1990, 11(4): 345–386.
73. Chesney WR. Rickets: An old form for a new century. *Pediatrics International*. 2003; 45: 509-11
74. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations and safety. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 842-856.
75. McKenna MJ, Freaney R. Secondary hyperparathyroidisms in the elderly: means to defining hypovitaminosis D. *Osteoporosis International* 1998; 8: 3-6.
76. Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ et al. Absence of seasonal variation in serum concentration of 1,25(OH) dihydroxyvitamin D despite a rise in 25 OH vitamin D in summer. *J Clin Endokrinol Metab* 1981; 53: 139-42.
77. Alshahrani F, Aljohani N. Vitamin D: Deficiency, Sufficiency and Toxicity *Nutrients* 2013;5:3605-3616; doi:10.3390/nu5093605
78. Chesney R.W. Metabolic bone disease. "Nelson Textbook of Pediatrics" (Ed. RE Behrman, RM Kliegmen, HB Jenson)'de. 17. Baskı. Saunders, Philadelphia 2003; 691: 2341-3243
79. Hatun Ş, Bereket A, Çalıkoğlu AS ve ark.'ı. Günümüzde D vitamini yetersizliği ve nütisyonel rikets* *Çocuk sağlığı ve hastalıkları dergisi* 2003; 46: 224-241.
80. Misra M, Pacaud D, Petryk A et al. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics* 2008; 122: 398-417.
81. Canadian Paediatric Society Indian and Inuit Health Committee. Vitamin D supplementation in northern Native communities (position statement). *Paediatr Child Health* 2002; 7(7): 459-63.

82. Department of Health. Dietary reference values for food energy and nutrients for the United Kingdom. London, HMSO. Report on Health and Social 1991; Subjects 41.
83. Fraser JD, Otawara Y, Price PA. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates the synthesis of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein by osteosarkoma cells. Mutually exclusive expression of vitamin K dependent bone proteins by clonal osteoblastic cell lines. *J Biol Chem* 1988; 263: 911.
84. Russel J, Lettieri D, Sherwood LM. Supression by 1,25(OH)₂D₃ of trancription of the pre-proparathyroid hormone gene. *Endocrinology* 1986; 119: 2864.
85. Naveh-Maney T, Silver T. Regulation of calcitonin gene transcription by vitamin D metabolites in vivo in the rat. *J Clin Invest* 1988; 81: 270.
86. Rowe DW, Kream BE. Regulation of collagen synthesis in fetal rat calvaria by 1,25- dihydroxyvitamin D₃. *J Biol Chem* 1982; 257: 8009
87. Morrison NA, Qi JC, Tokita A et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367: 284-287.
88. Schwarz A. New aspects of the treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2001;12:44–47.
89. Barletta GM, Smoyer WE, Bunchman TE, Flynn JT, Kershaw DB. Use of mycophenolate mofetil in steroid-dependent and-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2003;18(8):833–837.
90. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, Mecca G, Remuzzi G, Donati MB. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest*, 1982;46(1):16–23.
91. Bertani T, Remuzzi G, Rocchi G, Delaini F, Sacchi G, Falchetti M, Donati MB. Steroids and Adriamycin nephrosis. *Appl Pathol*, 1984;2(1):32–38.
92. Soylu MS, Rat Fizyolojisi, journal of clinical and analytical medicine,2010
93. Emre B, Salgırlı Y, denek fizyolojik özellikleri ve deneysel çalışma model oluşturmadaki zorlukları,2010.

94. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, Mecca G, Remuzzi G, Donati MB. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest*, 1982;46(1):16–23.
95. Weening JJ, Rennke HG. Glomerular permeability and polyanion in adriamycin nephrosis in the rat. *Kidney Int*, 1983;24(2):152–159.
96. Isao Matsui, Takayuki Hamano, Kodo Tomida, Kazunori Inoue, Yoshitsugu Takabatake, Yasuyuki Nagasawa, Noritaka Kawada, Takahito Ito, Hiroshi Kawachi, Hiromi Rakugi, Enyu Imai and Yoshitaka Isaka, Active vitamin D and its analogue, 22-oxacalcitriol, ameliorate puromycin aminonucleoside-induced nephrosis in rats, *Nephrol Dial Transplant* (2009) 24: 2354–2361
97. Yoshikazu Muroya, Osamu Ito, Rong Rong, Kenta Takashima, Daisuke Ito, Pengyu Cao, Yasuhiro Nakamura, Kensuke Joh, Masahiro Kohzuki, Disorder of fatty acid metabolism in the kidney of PAN-induced nephrotic rats, *American Journal of Physiology - Renal*
98. Wang Na, Wei Ri-Bao*, Li Qing-Ping, Yang Xi, Chen Xiang-Mei, Protective effects of astragaloside in rats with adriamycin nephropathy and underlying mechanism, *Diseases*, National Clinical Research Center for Kidney Diseases, Beijing, China, 2016
99. M. Vanessa Pérez-Gómez¹, Alberto Ortiz-Arduán¹, Víctor Lorenzo-Sellares², Vitamin D and proteinuria: a critical review of molecular bases and clinical experience, *Nefrologia* 2013;33(5):716-26
100. Llach F, Yudd M. Pathogenic, clinical, and therapeutic aspects of secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1998; 32: S3–12
101. Llach F, Velasquez Forero F. Secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure: pathogenic and clinical aspects. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: S20–S33
102. Levin A, Bakris GL, Molitch M *et al.* Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 2007; 71: 31–38

103. Crivello JF. Oxidative stress limits vitamin D metabolism by bovine proximal tubule cells *in vitro*. *Arch Biochem Biophys* 1988; 262: 471–480
104. Rincon J, Romero M, Viera N *et al*. Increased oxidative stress and apoptosis in acute puromycin aminonucleoside nephrosis. *Int J Exp Pathol* 2004; 85: 25–33
105. Liu H, Bigler SA, Henegar JR *et al*. Cytochrome P450 2B1 mediates oxidant injury in puromycin-induced nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2002; 62: 868–876
106. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J *et al*. Nephlin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7962–7967
107. Beltcheva O, Martin P, Lenkkeri U *et al*. Mutation spectrum in the nephrin gene (NPHS1) in congenital nephrotic syndrome. *Hum Mutat* 2001; 17: 368–373
108. Putaala H, Soininen R, Kilpelainen P *et al*. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1–8
109. Yamauchi K, Takano Y, Kasai A *et al*. Screening and identification of substances that regulate nephrin gene expression using engineered reporter podocytes. *Kidney Int* 2006; 70: 892–900
110. Takano Y, Yamauchi K, Hiramatsu N *et al*. Recovery and maintenance of nephrin expression in cultured podocytes and identification of HGF as a repressor of nephrin. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F1573–F1582
111. Naziye Ozkan, Ahmet Ozer Şehirli, Mehmet Koc, Şule Cetinel, Histomorphological Changes of Apelin Treatment in Renal Tissue in Doxorubicin-induced Nephrotic Syndrome Model, *Clin Exp Health Sci* 2016; 6(1): 20-7
112. Jane L. Finch, Edu B. Suarez, Kazim Husain, Leon Ferder, Michelle C. Cardema, Denis J. Glenn, David G. Gardner, Helen Liapis, and Eduardo Slatopolsky, Effect of combining an ACE inhibitor and a VDR activator on

- glomerulosclerosis, proteinuria, and renal oxidative stress in uremic rats, *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F141–F149, 2012.
113. A Azak, B Huddam, N Haberal, G Koçak, L Ortabozkoyun, M Şenes, MF Akdoğan, N Denizli, M Duranay, Effect of novel vitamin D receptor activator paricalcitol on renal ischaemia/reperfusion injury in rats, *Ann R Coll Surg Engl* 2013; 95: 489–494 doi 10.1308/003588413X13629960049117
 114. SuzukiA, ItoT, ImaiE, YamatoM, IwataniH, KawachiH, HoriM. Retinoids regulate the repairing process of the podocytes in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic rats, *J Am Soc Nephrol*. 2003 Apr;14(4):981-91.
 115. KDIGO. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl* 2013;3(1):1-150
 116. Taal MW, Brenner BM. Predicting initiation and progression of chronic kidney disease: Developing renal risk scores. *Kidney Int* 2006;70:1694-705
 117. Ruggenenti P, Perna A, Mosconi L, Pisoni R, Remuzzi G. Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. «Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia» (GISEN). *Kidney Int* 1998;53:1209-16.
 118. Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia). *Lancet* 1997;349:1857-63.
 119. Agarwal R, Acharya M, Tian J, Hippensteel RL, Melnick JZ, Qiu P, et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:2823-8
 120. Fishbane S, Chittineni H, Packman M, Dutka P, Ali N, Durie N. Oral paricalcitol in the treatment of patients with CKD and proteinuria: a randomized trial. *Am J Kidney Dis* 2009;54:647- 52.
 121. Palmer BF. Proteinuria as a therapeutic target in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2007;27:287-93.

122. Ruggenenti P, Perna A, Mosconi L, Pisoni R, Remuzzi G. Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. «Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia» (GISEN). *Kidney Int* 1998;53:1209-16.
123. Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia). *Lancet* 1997;349:1857-63.
124. Kidney Disease Outcomes Quality I. K/DOQI clinical practice guidelines on hypertension and antihypertensive agents in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2004;43(5 Suppl 1):S1- 290
125. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, et al. Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2012;367:2204-13.
126. Fernandez Juarez G, Luño J, Barrio V, de Vinuesa SG, Praga M, Goicoechea M, et al. Effect of dual blockade of the reninangiotensin
127. Agarwal R, Acharya M, Tian J, Hippensteel RL, Melnick JZ, Qiu P, et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:2823-8
128. Fishbane S, Chittineni H, Packman M, Dutka P, Ali N, Durie N. Oral paricalcitol in the treatment of patients with CKD and proteinuria: a randomized trial. *Am J Kidney Dis* 2009;54:647- 52.
129. Sanchez-Niño MD, Bozic M, Cordoba-Lanus E, Valcheva P, Gracia O, Ibarz M, et al. Beyond proteinuria: VDR activation reduces renal inflammation in experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302:F647-57.
130. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med*, 1998;339: 1448-1456.
131. Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. Protein overload activates proximal tubular cells to release vasoactive and inflammatory mediators. *Exp Nephrol*, 1999;7:420-428.

132. Hori Y, Yamada K, Hanafusa N, Okuda T, Okada N, Miyata T, Couser WG, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku F. Crry, a complement regulatory protein, modulates renal interstitial disease induced by proteinuria. *Kidney Int*, 1999;56(6):2096-2106.
133. Eddy AA, McCulloch L, Liu E, Adams J. A relationship between proteinuria and acute tubulointerstitial disease in rats experimental nephrotic syndrome. *Am J Pathol*, 1991;138:1111-1123.
134. Greco BA, Breyer JA. Cholesterol as a predictor of progression in nondiabetic chronic renal disease. *Contrib Nephrol*, 1997;120:48-61.
135. Joles JA, Rabelink TJ, Koomans HA. Role of lipids in progressive renal disease: Insight of the analbuminemic rats. *Contrib Nephrol*, 1997;120:120-131.
136. Savill J. Apoptosis: a mechanism for regulation of the cell complement of inflamed glomeruli. *Kidney Int*, 1992;41(3):607-612.
137. Mangan DE, Wahl SM. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol*, 1991;147(10):3408-3412.
138. Savill J, Smith J, Sarraf C, Ren Y, Abbott F, Rees A. Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. *Kidney Int*, 1992;42(4):924-936.
139. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Johnson RJ, Savill J. Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest*, 1994; 94(5):2105-2116.
140. Szabolcs MJ, Ward L, Buttyan R, D'Agati V. Apoptosis in human renal biopsies. *J Am Soc Nephrol*, 1994;5(3):844.
141. Coles HSR, Burne JF, Raff MC. Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development*, 1993;118:777-784.
142. Harrison DJ. Cell death in the diseased glomerulus. *Histopathology*, 1988;12(6):679-683

143. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J *et al.* Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1999; 96: 7962–7967
144. Beltcheva O, Martin P, Lenkkeri U *et al.* Mutation spectrum in the nephrin gene (NPHS1) in congenital nephrotic syndrome. *Hum Mutat* 2001; 17: 368–373
145. Putaala H, Soininen R, Kilpelainen P *et al.* The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1–8
146. Panichi V, Migliori M, Taccola D, *et al.* Effects of 1,25(OH)₂D₃ in experimental mesangial proliferative nephritis in rats. *Kidney Int* 60:87, 2001
147. Tan X, Li Y, Liu Y: Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 17:3382, 2006
148. Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3,382–3,393.
149. de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M *et al.* Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 1,543–1,551.