



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

**SİLOSTAZOL'ÜN YÜKSEK GLİKOZ SEVİYESİNE MARUZ
KALMIŞ GLOMERÜLLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ve
OTOFAJİNİN BU SÜREÇTEKİ ROLÜNÜN EX-VİVO OLARAK
İNCELENMESİ**

Halil İbrahim SAYGI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gözde ERKANLI ŞENTÜRK

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Histoloji ve Embriyoloji Programı

Haziran, 2023

Lisansüstü eğitimim boyunca bana çokça emekleri geçen Prof. Dr. İsmail Seçkin, Prof. Dr. Meral Koyutürk ve Prof. Dr. Gözde Erkanlı Şentürk hocalarıma ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

SİLOSTAZOL'ÜN YÜKSEK GLİKOZ SEVİYESİNE MARUZ KALMIŞ GLOMERÜLLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ve OTOFAJİNİN BU SÜREÇTEKİ ROLÜNÜN EX-VİVO OLARAK İNCELENMESİ

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.

TEŞEKKÜR

Doktora tezim süresince bana hep en güzel şekilde destek olan ve her zaman anlayışla karşılayan danışmanım Prof. Dr. Gözde Erkanlı Şentürk'e,

Yüksek lisans tez danışmanım olup doktora sürecinde de beni inceliklerle takip eden değerli hocam Prof. Dr. İsmail Seçkin'e,

Lisansüstü eğitimim süresince kendilerinden çokça şey öğrendiğim başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Meral Koyutürk olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. E. Elif Güzel Meydanlı, Doç. Dr. Gamze Tanrıverdi ve Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu'na,

İstanbul Medeniyet Üniversitesi'nden hocalarım Prof. Dr. Ünal Uslu, Doç. Dr. Şule Ayla, Dr. Öğr. Üyesi Elif Gelenli Dolanbay'a ve asistan arkadaşlara,

Tez çalışmamın deney hayvanları kısmında bana yardımcı olan Vet. Tek. Nurhayat Dönek ve Vet. Hek. Mert Çelikten ile elektron mikroskop incelemeleri aşamasında bana destek olan Betül Depegöz ve Ebru Akyön'e,

Temel bilimler bölümü içerisinde her gün güler yüzle selamlaştığımız kıymetli hoca ve arkadaşlara,

Bölüm içerisinde muhabbetleriyle hep yanımızda olan Uğur Hepcan, İbrahim Kaptan ve diğer görevli arkadaşlara,

Anabilim dalında, asistan odasında ve laboratuvarlarda sıcak ortam oluşturan Uzm. Dr. Duygu Neccar, Uzm. Dr. Kübra Çakıllı, Uzm. Dr. H. Nurdan Olcar, Uzm. Dr. Özgür Uzun, Öğr. Gör. Dr. Belisa Kaleci, Arş. Gör. Hakan Şahin, Arş. Gör. Beyza Sağ ve Dr. Meryem Purelka'ya

Lisansüstü eğitim sürecini beraber geçirmiş olmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Serbay Özkan, Arş. Gör. Dr. Başak Işıldar ve Arş. Gör. Dr. Zehra Sezer'e,

Ve hep en güzel şekilde yanımda olan aileme
...en içten teşekkürlerimle.

Haziran 2023

Halil İbrahim SAYGI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Böbrek Cisimciği Embriyolojisi	4
2.2. Böbrek Cisimciği Histolojisi	6
2.3. Glomerüler Filtrasyon Bariyeri.....	8
2.3.1. Glomerüler Endotel Hücreleri	8
2.3.2. Glomerüler Bazal Membran.....	9
2.3.3. Glomerüler Visseral Epitel Hücreleri / Podositler	9
2.4. Diyabetik Nefropati	10
2.4.1. Diyabetik Nefropatide Endotel Hücre Hasarı	11
2.4.2. Diyabetik Nefropatide Glomerüler Bazal Membran Değişiklikleri	12
2.4.3. Diyabetik Nefropatide Podosit Davranışı	12
2.4.5. Diyabetik Nefropatide Podosit - Endotel Etkileşimi.....	13
2.5. Silostazol ve Etki Mekanizmaları	14
2.6. Silostazol ve Diyabetik Nefropati	15
3. YÖNTEM	16
3.1. Gereçler.....	16
3.1.1. Alet ve Teçhizat	16
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	17

3.1.3. Cihazlar	18
3.2. Nefrektomi	19
3.3. Glomerül İzolasyonu.....	19
3.4. <i>Ex-Vivo</i> Kültürleme	21
3.5. Numunelerin Elde Edilmesi.....	21
3.5.1. Işık Mikroskopisi Takibi.....	22
3.5.2. Geçirimli Elektron Mikroskopisi Takibi.....	22
3.6. Histokimyasal İncelemeler	22
3.7. Ultrastrüktürel İncelemeler	23
3.8. İmmünfloresan Boyamalar	23
3.9. ELISA Ölçümleri.....	24
3.10. İstatistiksel Analizler	24
4. BULGULAR	25
4.1. Glomerül İzolasyonu.....	25
4.2. Histokimyasal Bulgular	26
4.2.1. Hematoksilen & Eozin Boyama Bulguları.....	26
4.2.2. Periyodik Asit Schiff & Hematoksilen Kombine Boyama Bulguları	28
4.3. Glomerüler Alan ve Glomerüler Hücre Miktarı Değerlendirmesi.....	29
4.4. Ultrastrüktürel Bulgular	30
4.5. Glomerül Korunumunun Değerlendirilmesi: Nefrin/WT1	35
4.6. Endotel ve Podosit Hücrelerinin Dağılımının Değerlendirilmesi: Synpo/CD31	39
4.7. Fonksiyonel Birim Değerlendirmesi: Nefrin/CD31	43
4.8. Glomerüllerin Proliferatif Hücreler Açısından Değerlendirilmesi: Ki67/CD31	46
4.9. Otofajik Yanıt Değerlendirmesi: LC3-I/WT1	49
4.10. Glomerüllerin Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT) Açısından Değerlendirilmesi: Vimentin/WT1	52
4.11. Apoptotik Hasar Değerlendirmesi: Kaspaz-3/WT1.....	55
4.12. Hücreler Arası Etkileşim Faktörlerinin Değerlendirilmesi.....	58
5. TARTIŞMA.....	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR.....	71
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	85
ETİK KURUL İZİN YAZISI	86
KURUM İZİNİ YAZILARI.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2-1: Nefronun ve glomerülün gelişim aşamaları [17].	5
Şekil 2-2: Böbrek cisimciği histolojisi [37].	7
Şekil 2-3: Glomerüler filtrasyon bariyeri ve glomerüler bazal membranın şematik (üstte) ve elektron mikroskopik gösterimi (altta) [4].	8
Şekil 2-4: Diyabetik nefropatide meydana gelen patolojiler [59].	10
Şekil 2-5: Silastazol etki mekanizmasının şematik gösterimi [109].	14
Şekil 3-1: Glomerül izolasyonu aşamalarından görüntüler.	20
Şekil 3-2: Deney dizaynı	21
Şekil 4-1: İzole edilmiş glomerüllerin faz kontrast mikroskopuyla gösterimi.	25
Şekil 4-2: Hematoksilen & Eozin boyaması ile yapılan histomorfolojik değerlendirmeye ait mikrograflar.	27
Şekil 4-3: Periyodik Asit Schiff & Hematoksilen kombine boyaması ile yapılan mezengiyal alan değerlendirmesine ait mikrograflar.	28
Şekil 4-4: Glomerüler mezengiyal alan oranlarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafik.	29
Şekil 4-5: Glomerüler alan büyüklüklerini (A) ve glomerüler hücre sayılarını (B) gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafikler.	30
Şekil 4-6: Farklı gruplara ait glomerüllerin genel durumunu gösteren elektron mikroskopik görüntüler.	31
Şekil 4-7: Kollobe olmuş kapillerleri ve glomerüler bazal membrandan koparak ayrılmış pediselleri gösteren görüntüler. (Glikoz + Klorokin grubu, bar: 2 µm)	32
Şekil 4-8: Otofagozom yapılarını (beyaz ok) gösteren elektron mikroskopik görüntüler. (Glikoz + Klorokin grubu; A - B: Podosit, C - D: Mezengiyal hücre).	32
Şekil 4-9: Podositlerde görülen üzeri ribozomlarla çevrili genişlemiş vezikülleri (siyah asteriks) ve yakın komşuluğundaki mitokondrileri (beyaz asteriks) gösteren elektron mikroskopik görüntüler. (Glikoz + Klorokin grubu)	33

Şekil 4-10: Mezengiyal hücrelerde çekirdek etrafında izlenen üzeri ribozomlarla çevrili genişlemiş veziküler yapı. (Glikoz + Klorokin grubu).....	34
Şekil 4-11: GBM kalınlıklarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafik.....	34
Şekil 4-12: Ultrastrüktürel incelemeyle glomerüler bazal membran üzerinden yapılan morfolometrik analize ait mikrograflar.	35
Şekil 4-13: Glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.	36
Şekil 4-14: Glomerüllerdeki nefrin pozitiflik oranlarını (A) ve podosit sayılarını (B) gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafikler.	37
Şekil 4-15: Kontrol gruplarına ait glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini ayrı ayrı gösteren mikrograflar.....	37
Şekil 4-16: Hasar ve tedavi gruplarına ait glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini ayrı ayrı gösteren mikrograflar.....	38
Şekil 4-17: Glomerüllerin sinaptopodin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	40
Şekil 4-18: Glomerüllerdeki sinaptopodin (A) ve CD31 (B) pozitiflik oranlarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafikler.	41
Şekil 4-19: Kontrol gruplarına ait glomerüllerin sinaptopodin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini ayrı ayrı gösteren mikrograflar.....	41
Şekil 4-20: Hasar ve tedavi gruplarına ait glomerüllerin sinaptopodin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini ayrı ayrı gösteren mikrograflar.	42
Şekil 4-21: Glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.	43
Şekil 4-22: Glomerüllerdeki nefrin/CD31 kolokalizasyon oranları gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafik.	44
Şekil 4-23: Kontrol grubuna ait glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	44
Şekil 4-24: Hasar ve tedavi grubuna ait glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	45
Şekil 4-25: Glomerüllerin Ki67 (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.	46
Şekil 4-26: Glomerüllerdeki Ki67 pozitif hücre sayılarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafik.	47

Şekil 4-27: Kontrol gruplarına ait glomerüllerin Ki67 (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	47
Şekil 4-28: Hasar ve tedavi gruplarına ait glomerüllerin Ki67 (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	48
Şekil 4-29: Glomerüllerin LC3-I (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.	49
Şekil 4-30: Glomerüllerdeki LC3-I pozitiflik oranlarını gruplar arası karşılaştırmalı gösteren grafik.....	50
Şekil 4-31: Kontrol grubuna ait glomerüllerin LC3-I (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	50
Şekil 4-32: Hasar ve tedavi grubuna ait glomerüllerin LC3-I (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	51
Şekil 4-33: Glomerüllerin vimentin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.	52
Şekil 4-34: Glomerüllerdeki vimentin pozitiflik oranlarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafik.	53
Şekil 4-35: Kontrol grubuna ait glomerüllerin vimentin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	53
Şekil 4-36: Hasar ve tedavi grubuna ait glomerüllerin vimentin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	54
Şekil 4-37: Glomerüllerin kaspaz 3 (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	55
Şekil 4-38: Glomerüllerdeki kaspaz 3 pozitif hücre sayılarını gruplar arası karşılaştırmalı gösteren grafik.	56
Şekil 4-39: Kontrol grubuna ait glomerüllerin kaspaz 3 (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	56
Şekil 4-40: Hasar ve tedavi grubuna ait glomerüllerin kaspaz 3 (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar.....	57
Şekil 4-41: Glomerüllerin kültüre edildiği medyumdaki Angpt1 (A), Angpt2 (B), SDF-1 (C) ve VEGF-A (D) miktarlarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafikler.	59

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

ANGPT1	: Anjiyopoetin 1
ANGPT2	: Anjiyopoetin 2
BSA	: Sığır Serum Albümini
DN	: Diyabetik Nefropati
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm
GBM	: Glomerüler Bazal Membran
GFB	: Glomerüler Filtrasyon Bariyeri
HBSS	: Hanks'in Dengeli Tuz Çözeltilisi
H&E	: Hematoksilen & Eozin
NO	: Nitrik Oksit
PAS&H	: Periyodik Asit Schiff & Hematoksilen
PDGF-BB	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü - BB
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDF-1	: Stromal Hücre Kaynaklı Faktör - 1
VEGF-A	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-Alfa
VEGFR2	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
YGS	: Yüksek Glikoz Seviyesi

ÖZET

DOKTORA TEZİ

SİLOSTAZOL'ÜN YÜKSEK GLİKOZ SEVİYESİNE MARUZ KALMIŞ GLOMERÜLLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ve OTOFAJİNİN BU SÜREÇTEKİ ROLÜNÜN EX-VİVO OLARAK İNCELENMESİ

Halil İbrahim SAYGI

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Histoloji ve Embriyoloji Programı

Danışman: Prof. Dr. Gözde ERKANLI ŞENTÜRK

Yüksek glikoz seviyesiyle seyreden diyabet, glomerüllerde hasar oluşturarak önce Diyabetik Nefropati ve devamında Kronik Böbrek Yetmezliği gibi ağır sonuçlar verebilmektedir. Yüksek glikozun glomerüllerde oluşturduğu hasarların mekanizmasına dair elde edilen veriler artmasına rağmen glomerüllerin bu hasarlardan nasıl korunacağına dair bilgiler kısıtlı kalmıştır. Silastazolle indüklenen glomerüler endotel hücrelerinin glomerülün korunmasındaki rolünü ve silastazolün glomerül otofajisine etkisi için incelemek gerçekleştirilen bu tez çalışmasında sağlıklı sıçanlardan glomerüller izole edilmiş ve ex-vivo olarak kültür ortamında çalışılmıştır. Glomerül izolasyonunun ve kültürleme işlemlerinin başarılı olduğu tespit edildikten sonra glomerüller yüksek glikoza maruz bırakılarak diyabet modellemesi yapılmıştır. Ex-vivo kültürlemeyle diyabet etkisi oluşturulan glomerüllerde mezengiyal alanda artış ve glomerüler bazal membran kalınlaşması gibi klasik diyabetik glomerülopati lezyonları tespit edilmiştir. Glikozla beraber silastazol uygulanan glomerüllerdeki (SG) bu bulgular daha hafif seyretmiştir. Glomerüller, podosit belirteçleri açısından incelendiğinde nefrin ekspresyonu ve podosit sayısı bakımından Glikoz grubunda Kontrol grubuna göre azalma tespit edilmişken SG grubunda korunma görülmüştür. Klorokin uygulanan grupta nefrin ve podosit sayısındaki korunma ortadan kalkmış olarak bulunmuştur. Sinaptopodin ve CD31 işaretlemesiyle podosit ve endotel hücrelerinin etkilenmesi ayrı ayrı araştırıldığında endotel hücrelerinin daha fazla hasar aldığı, silastazol verilen gruplarda ise endotel hücrelerinin kısmen korunduğu ve bu korunmaya sinaptopodin belirteciyle tespit edilen podosit korunmasının eşlik ettiği görülmüştür. Nefrin ve CD31 ikili işaretlemesiyle glomerüler filtrasyon bariyerinin (GFB) korunması değerlendirildiğinde silastazol uygulanan glomerüllerde ikili korunmanın anlamlı oranda daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Silastazolün glomerüler endotel hücrelerindeki çoğalmayı tetiklerken apoptozu baskıladığı görülmüştür. Otofaji açısından incelenen glomerüllerde silastazolün glomerüler hücrelerdeki otofajiyi hızlandırdığı, apoptoz miktarını ise azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmayla silastazolün endotelial hücreleri koruyarak podosit ve glomerüler korunmasını artırdığını ve bu korunmada otofajinin belirgin bir rol oynadığını göstermiş olmaktadır.

Haziran 2023 , 103 sayfa.

Anahtar kelimeler: Glomerül, Endotel, Podosit, Silastazol, Otofaji

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CILOSTAZOL ON GLOMERULI EXPOSED TO HIGH GLUCOSE LEVELS AND THE ROLE OF AUTOPHAGY IN THIS OCCASION

Halil İbrahim SAYGI

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Histology and Embryology

Histology and Embryology Programme

Supervisor: Prof. Dr. Gözde ERKANLI ŞENTÜRK

Hyperglycemia caused by diabetes causes damage in glomeruli and can lead to diabetic nephropathy and chronic kidney failure subsequently. Although the data about the mechanisms of glomerulopathy caused by hyperglycemia increases there is still no remedy about how to protect glomeruli. This study is designed to investigate the role of glomerular endothelial cells activated by cilostazol in glomerulus protection and the effects of cilostazol on the autophagy occurring in glomerulus. For this aim glomeruli were isolated from healthy rats and studied in culture *ex-vivo*. After checking the success of glomerulus isolation, diabetic nephropathy model was established by exposing isolated glomeruli to high glucose level. Classical diabetic nephropathy lesions like mesangial matrix expansion and glomerular basement membrane thickening were detected in these glomeruli which experience diabetes effect in *ex-vivo* culture. The diabetic nephropathy like lesions were alleviated in glomeruli treated with cilostazol along with high glucose (SG group). When the glomeruli were examined in point of nephrin expression and number of podocytes, in Glucose group a statistically significant decrease was spotted whereas they are protected in SG group. The prevention disappeared in chloroquine added group. The status of podocytes and endothelial cells were examined by applying synaptopodin and CD31 labelling. This examination revealed that endothelial cell damage in Glucose group was prevalent but in cilostazol added groups endothelial cells are better preserved which is accompanied by synaptopodin protection in podocytes. Double immunofluorescence of nephrin and CD31 revealed that glomerular filtration barrier structure was significantly well preserved in cilostazol groups. It also found that cilostazol upregulates proliferative character in glomerular endothelial cells and suppresses apoptosis. Furthermore, glomeruli were inspected in terms of autophagy and it is showed that cilostazol increases the autophagic flux in glomerular cells and suppresses apoptotic cell number. As a result, our findings proved that cilostazol leads to whole glomerular protection by protecting endothelial cells and autophagy has a significant role in this protection.

June 2023, 103 pages.

Keywords: Glomerulus, Endothelium, Podocyte, Cilostazol, Autophagy,

1. GİRİŞ

Böbreklerin temel fonksiyonel birimi olan nefron, böbrek cisimciği adı verilen ve filtrasyon bölgelerini içeren yapıyla başlar. Böbrek cisimciği içerisinde bulunan ve glomerül adı verilen kapiller ağdan geçen kan, burada bulunan glomerüler filtrasyon bariyeri (GFB) vasıtasıyla tübüler sisteme aktarılan ultra-filtratı oluşturur. Bu ultra-filtrat daha sonra tübüler sistemde geri emilime tabi tutularak gerekli metabolitlerin alınması sonrası vücuttan uzaklaştırılacak idrarı oluşturur. Bütün nefron yapısı içerisinde en kritik noktayı glomerül ve üzerindeki podositlerden oluşan GFB teşkil etmektedir [1]. Kronik böbrek hastalığının (KBH) en yaygın sebepleri olan diyabet ve yüksek tansiyon GFB'yi bozarak böbrek hasarına neden olmaktadır [2]. Bu sebeple glomerüldeki hasar ve iyileşme mekanizmalarının araştırılması son derece önemlidir.

GFB'yi oluşturan yapılar içten dışa doğru; kapillerleri oluşturan endotel hücreleri, glomerüler bazal membran (GBM) ve üriner saha tarafındaki podositlerdir. Bu bariyer, fizyolojik şartlarda büyüklük ve elektriksel yüke (şarja) bağlı olarak yüksek derecede seçici geçirgenlik gösteren bir yapıdır [3]. Seçiciliğin içten dışa doğru azaldığı, tutulumun en fazla endotel hücreleri tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir [4]. GFB'yi oluşturan yapılarda meydana gelen bir hasar filtrasyon işleminin bozulmasına ve makromoleküllerin ultra-filtrata karışmasına neden olmaktadır [4]. Hasarın geri döndürülememesi ve ilerlemesi durumunda filtrasyon bariyerinden makromolekül geçişi artmaktadır. Bu artmış miktardaki makromoleküllerin tübüllerden geri emilimi tübüler hücrelerde stres ve hasara sebep olmaktadır [5]. Tübüler geri emilimin bozulması veya yeterli gelmemesiyle birlikte idrarda albümin ortaya çıkmaktadır. Albüminüri olarak isimlendirilen bu durum nefropati teşhisinde önemli bir bulgudur.

Diyabetin en ciddi mikrovasküler komplikasyonlarından birisi olan diyabetik nefropati (DN) diyabetli hastaların %30-40'ında ortaya çıkmakta olup son aşama böbrek hastalığının en başta gelen sebebidir [6]. Diyabetin bir sonucu olan yüksek glikoz seviyesi (YGS) vücuttaki tüm kapillerlerde olduğu gibi glomerüler kapillerlerde de hasara neden olmakta ve böylece glomerül hasarını tetiklemektedir [7]. Glomerülde ilk hasar gören hücreler endotel hücreleri olsa da YGS'nin, glomerüler hücrelerin her birinde ayrı ayrı hasar oluşturduğu bilinmektedir [8, 9]. Glomerülopati olarak değerlendirilen bu glomerüler hasarlar, bugüne kadar çokça ve ayrıntılı bir şekilde çalışılmış ve glomerül kaybına giden süreçte en önemli patolojik bulgu olarak

podosit kaybı tanımlanmıştır [10]. Podositler glomerüllerin kaderinde belirleyici olarak görülseler de bu etkinin podositlerin yapısal ve fonksiyonel kısıtlılıkları (bölünebilme yeteneğinin olmaması, son derece farklılaşmış hücreler olması, mekanik strese karşı dayanıksız konumda olmaları, vb.) sebebiyle neden oldukları ‘darboğaz etkisi’nden (bottleneck effect) kaynaklandığı düşünülmektedir [11]. Podositlerin kaybı glomerül için geri dönülmez bir nokta oluşturmakta ve bu sebeple geç bir bulgu olarak karşımızda durmaktadır. Podosit kaybı meydana gelmeden önce, glomerülde oluşan hasarların glomerül içerisinde, glomerüler hücreler arasındaki etkileşimle (intraglomerular crosstalk) dengelenme ve düzeltilme süreci söz konusudur [12, 13]. Nitekim her yüksek glikoz veya yüksek tansiyona maruz kalan hastada böbrek hasarı oluşmaması bunun en büyük kanıtlarından biridir. Bu glomerül içi etkileşim ve dengeleme sürecinin araştırılması glomerülopatilerin böbrek kaybına varmadan iyileştirilebilmesi için son derece önemlidir. Ayrıca podositler her ne kadar bölünebilme ve kendilerini yenileme imkânına sahip olmasalar da, başka hücreler tarafından yenilenebildikleri gösterilmiştir [14, 15]. Bu yenilenmeyi sağlayan ve düzenleyen de yine glomerül içi etkileşimlerdir. Bu bakımdan glomerülopatileri, podosit kaybıyla başlayıp böbrek kaybıyla bitebilen sürece girmeden tedavi edebilmek için glomerüler hücreler arasındaki etkileşimin araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Glomerül oluşum sürecinin endotel hücreleriyle podosite köken verecek hücreler arasındaki etkileşimle başlıyor olması endotel podosit ilişkisini son derece önemli kılmaktadır [16, 17]. Gelişim sürecinde podositleri oluşturacak öncül hücreler apikal kısımlarda epitel benzeri bağlantılar yapan hücre kümesi olarak ortaya çıkmaktadır [18]. Bu hücreler VEGF-A yoluyla anjiyoblastları bu bölgeye çekmekte ve buraya göç eden anjiyoblastlar endotele farklılaşarak kapillerleri oluşturmaktadır. Podosit öncülü olan hücrelerin olgun podosite farklılaşması (apikal bağlantıların bazale doğru kayarak fonksiyonel filtrasyon yarıklarını oluşturmasıyla görülebileceği üzere) endotel hücrelerinin varlığında meydana gelmektedir [17].

Birçok hücresel özellik bakımından podositler nöronlara, glomerüler filtrasyon bariyeri de kan beyin bariyerine benzerlik göstermektedir. Nöronlar üzerinde yapılan çalışmalar endotel hücreleriyle nöronlar arasında yüksek düzeyde etkileşim ve yakın ilişki olduğunu ortaya koymuştur [19–21]. Bu çalışmalar nöronların farklılaşmasında ve yerleşiminde vasküler yapıların rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca endotel hücrelerinin fizyolojik şartlarda kan-beyin bariyeri için kritik ve yönlendirici bir etkisi olduğu bilinmektedir [22, 23]. Nöronlardan elde

edilen bu bulgular, endotel hücrelerinin podositler ve glomerüler filtrasyon bariyeri için de son derece önemli olduğunu göstermektedir.

Önceki çalışmalarımızda genişlemiş mezengiyal alan içerisinde yeni kapiller oluşumunu düşündürtecek hücre hareketliliği olduğu tespit edilmiştir [24, 25]. Bu çalışmalarda mevcut kapillerlerden dallanma yoluyla glomerül içerisinde yeni kapillerler oluşturmaya doğru giden endotel hücrelerinin farklı evreleri ultrastrüktürel olarak gösterilmiştir. Bütün bu bulgular glomerül içerisinde endotel hücre aktivitesinin yüksek olduğunu ve endotel hücrelerinin sade bir bariyer elemanı olmaktan öte, glomerül yapısını dönüştüren bir etken olduğunu düşündürmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında endotel podosit etkileşimini gösterebilecek bir araştırma yapılması gerekliliğiyle bu doktora tezi tasarlanmıştır. Bu sebeple glomerüllerin direkt etkilenebilmesi ve gözlemlenebilmesi için *ex-vivo* kültür yöntemi kullanılmıştır. Sağlıklı sıçanlardan alınan böbrekler glomerül izolasyonuna tabi tutulmuş ve izole edilen glomerüller kültür ortamında çalışılmıştır. Yüksek glikoza maruz bırakılan glomerüller endotel hücrelerinin metabolik aktivitesini artıracak silastazol ajanıyla muamele edilmiş ve bu sayede glomerül içerisindeki endotel hücrelerinin glomerülde oluşan hasar karşısında gösterdikleri değişimler incelenmiştir. Bu hasar ve bu hasar karşısında korunma süreçlerinde otofaji yolağının oynadığı rolün gösterilebilmesi için de klorokin etken maddesi kullanılarak otofajinin durdurulması işlemi de uygulanmıştır.

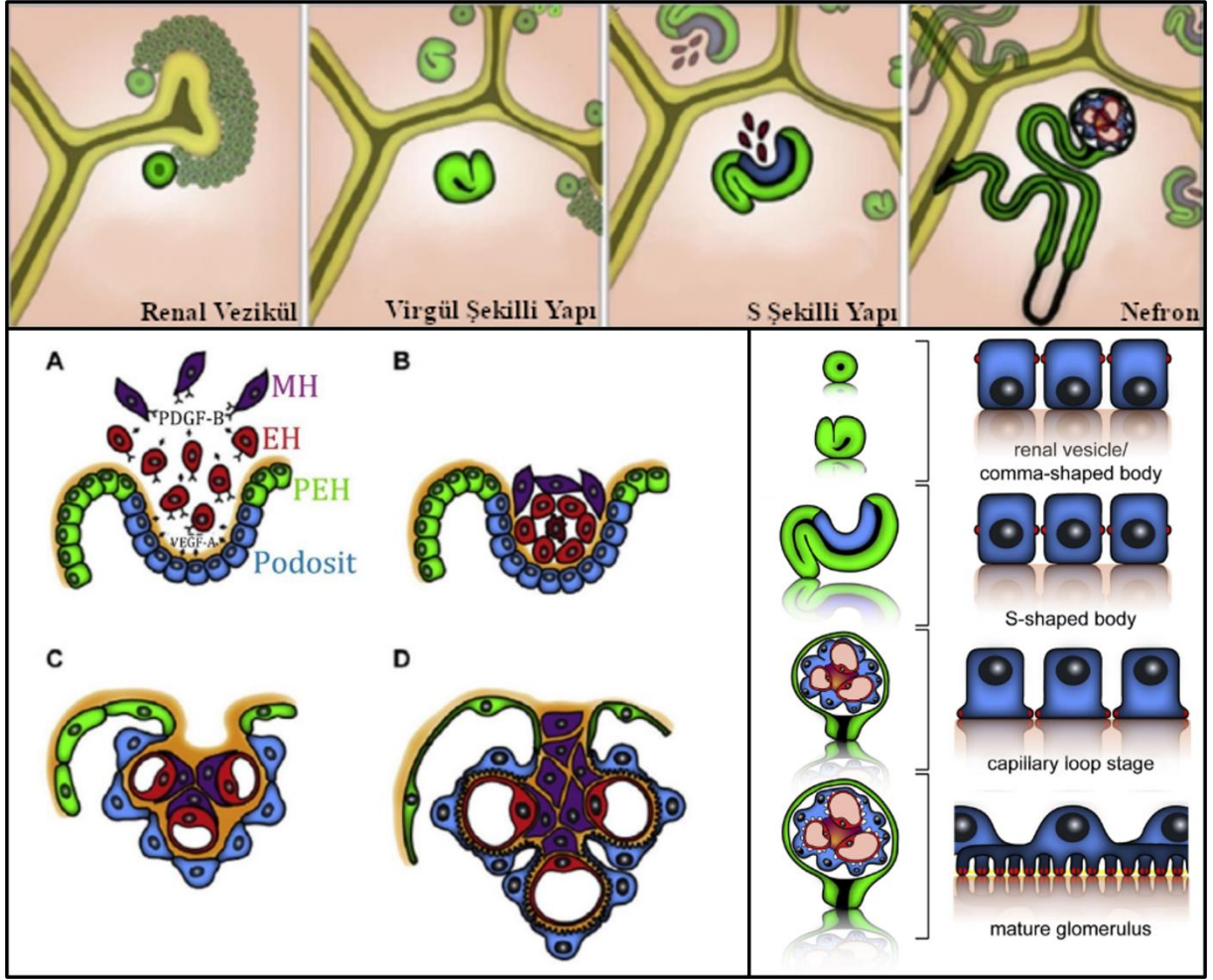
2. GENEL BİLGİLER

Vücudu metabolik atıklardan arındırmak ve vücut homeostazını sağlamak görevlerini yürüten böbrekler vertebranın iki yanında retroperitoneal yerleşimli olarak bulunurlar. Dıştan ince bir bağ dokusu kılıfı ile sarılı olan bu organ histolojik olarak iki kısımda incelenir. Sagittal olarak ikiye ayrıldığında koyu kırmızı kahverengi olarak görülen dış ince kısım korteks, açık renkte görülen içteki kısım ise medulla olarak adlandırılır. Bu histolojik ayrımı sağlayan temel faktör, böbreğin temel fonksiyonel birimi olan nefronun böbrek içindeki yerleşiminden kaynaklanmaktadır. Korteks bölgesi, nefronun başlangıç kısmı olan böbrek cisimciklerini ve kıvrıntılı tubülleri içerirken, medulla bölgesi düz tubülleri ihtiva etmektedir. Nefron, filtrasyon işleminin gerçekleştiği yer olan böbrek cisimciği yapısından ve devamındaki geri Emilimi sağlayan tubüler yapıdan oluşmaktadır. Böbrek cisimciği kandan ultra filtrat oluşumunu sağladıktan sonra devamındaki tubüler sistem vücut için gerekli olan metabolitleri geri alarak ultra filtratı idrara indirir ve vücuttan uzaklaştırılmak üzere renal pelvise iletir.

Yetişkin bir insanın bir böbreğinde ortalama 1 milyon böbrek cisimciği / glomerül bulunmaktadır [26]. Glomerüllerin büyüklükleri korteks içinde bulundukları bölgelere göre değişmektedir. Kortikal glomerüllerin çapı ortalama 150 µm kadar olabilirken juxtamedullar glomerüller ortalama 250 µm çapa kadar ulaşabilmektedir [27]. Sıçanlarda ise glomerül sayısı böbrek başına 30 bin olup ortalama büyüklükleri 120 µm'dir [26].

2.1. Böbrek Cisimciği Embriyolojisi

Böbrek cisimciğini de içeren nefron yapısı, kalıcı böbrek (metanefroz) oluşumu esnasında dallanan üreterik çıkıntının uçlarındaki mezenkimal hücre yoğunlaşmasından köken almaktadır [28]. Üreterik çıkıntının etrafında bir şapka gibi bulunan bu hücre kitlesi nefrona ait yapıları oluşturmak üzere indüklenir ve sırasıyla renal vezikül, virgül şekilli yapı ve S şekilli yapı olmak üzere bir dizi morfolojik form alır (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Nefronun ve glomerülün gelişim aşamaları [17]. Dallanan üreterik çıkıntı etrafında toplanan mezenkimal hücre kitlesinin sırasıyla oluşturduğu morfolojik formlar (üstte). Virgül şekilli yapının distal ucunda oluşan girinti bölgesinde gelişen glomerül yapısı (alt solda). Girintinin etrafındaki hücreler paryetal epitel hücre olarak belirlenirken girintiyi oluşturan hücreler visseral epitel hücre (podosit) olarak belirlenir (A). Bu girinti içine göç eden endotel hücre öncülleri ve mezengiyal hücreler glomerül yapısının oluşumuna katılır (B, C, D). Nefronun gelişimi süresince podositleri oluşturacak hücrelerin geçirdiği morfolojik değişimler (alt sağda).

Normalde mezenkimal karakterde olan üreterik çıkıntı etrafındaki bu hücre toplulukları, ilk olarak renal vezikül oluşumu esnasında mezenkimal epitelyal dönüşüm geçirerek nefronun gelecekteki epitelyal formuna geçiş yapar [17]. Renal vezikülün bölünmelerle genişleyip uzamasıyla birlikte virgül şekilli yapı oluşur. Daha sonra virgül şekilli yapının en distal ucunda oluşan girintiyle birlikte S şekilli yapı oluşmuş olur [29]. S şekilli yapının proksimali nefronun tübüler kısmını oluşturmak üzere uzayıp gelişirken distal uçta oluşan girinti gelecekte glomerülün oluşacağı bölge, bu girinti içerisindeki hücreler de podosit öncülü hücreler olarak

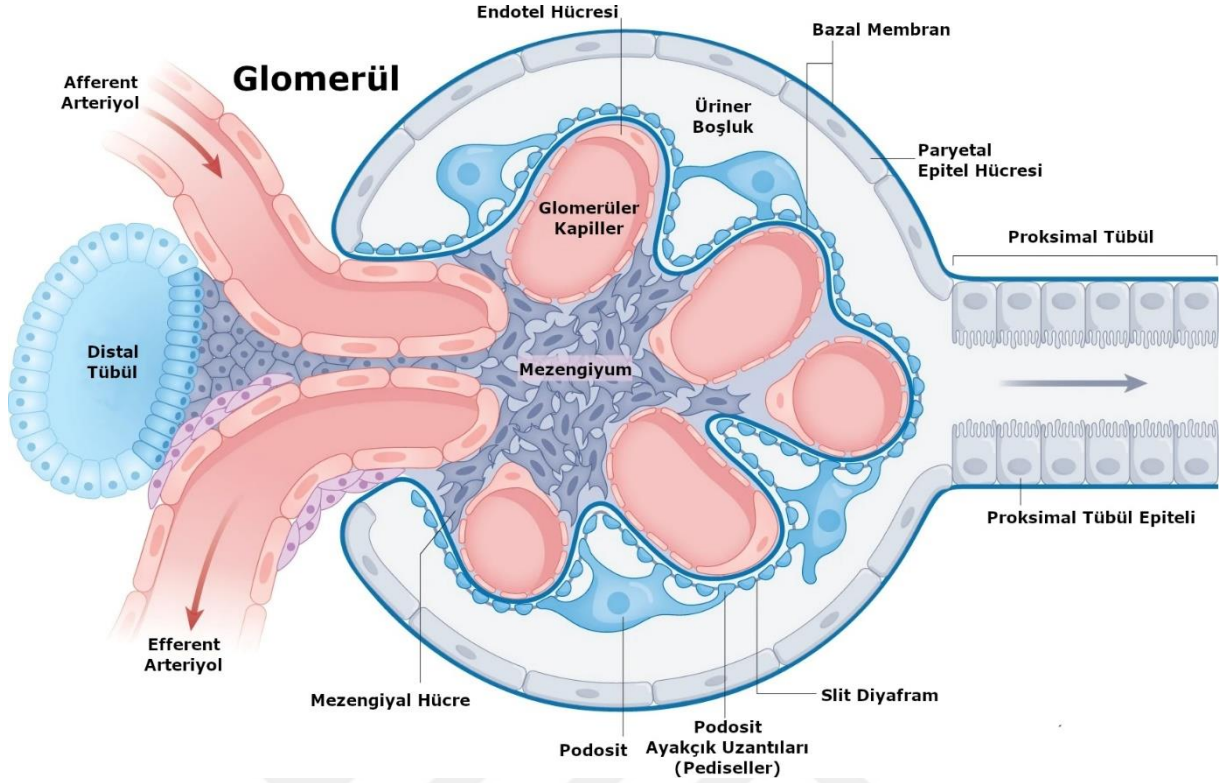
belirlenmiş olur [17]. Podosit öncülü hücrelerin farklılaşmış podosite doğru evrilmesi, bu bölgedeki hücrelerin VEGF-A salınımı yoluyla bu bölgeye endotel hücre öncüllerini çekmesiyle başlamaktadır [30, 31]. Bu bölgeye gelerek endotel hücreleri oluşturmaya başlayan endotel hücre öncülleri aynı zamanda PDGF-B salınımı vasıtasıyla mezengiyal hücreleri glomerül içerisine çeker [32]. Girintinin etrafında kalan hücreler yassı form alarak Bowman kapsülünün paryetal yaprağını oluştururken podositler, endotel hücreleri ve mezengiyal hücreler glomerülü oluşturacak şekilde özelleşirler (Şekil 2-1).

Renal vezikül ve virgül şekilli yapı aşamalarında epitelyal karakter taşıyan podositler, S şekilli yapı aşamasında endotel öncülü hücrelerin gelmesiyle birlikte bazı epitelyal özelliklerini kaybederek ve daha mezenkimal bir forma geçerler [17]. Bu kısmi epitelyal mezenkimal dönüşüm süreci podositlerin gelişmiş morfolojilerini oluşturmaları için gereklidir. Bu süreçte epitelyal hücrelere ait tipik sıkı bağlantı elemanları ortadan kalkarken slit diyafram yapısındaki bağlantı elemanlarının ekspresyonu başlar [33]. Bu durum morfolojik olarak apikalde yer alan bağlantı bölgelerinin bazale doğru yer değiştirmesi olarak izlenir.

Endotel öncülü hücrelerin glomerül içerisine göç etmesi için podosit öncülü hücreler tarafından salgılanan VEGF-A, fonksiyonel filtrasyon bariyeri oluşumu için gereklidir [34]. Endotel hücrelerinin göç etmesinde ortaya çıkan sorunlar filtrasyon bariyerinin oluşumunu başarısız kılmaktadır. VEGF-A'nın yanı sıra yine podositlerden salgılanan Anjiyopoetin 1 faktörü kapillerlerin oluşumunu ve stabilizasyonunu sağlamaktadır [35, 36].

2.2. Böbrek Cisimciği Histolojisi

Dolaşımdaki kan, afferent arteriyoller vasıtasıyla böbrek cisimciğine giriş yapar. Böbrek cisimciği içindeki bir dizi kapiller halkadan geçen kan, efferent arteriyoller yoluyla böbrek cisimciğinden ayrılır. Böbrek cisimciği içerisindeki bu kapiller yumak glomerül olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2-2). Kapiller yumağın iç kısmını bir yastık şeklinde mezengiyal hücreler ile mezengiyal matriks döşemekte ve kapillerlere yapısal destek oluşturmaktadır. Arteriyollerin girip çıktığı kısım arteryal kutup olarak bilinirken, filtratın tübüllere aktarıldığı tam karşı tarafı üriner kutup olarak isimlendirilir.



Şekil 2-2: Böbrek cisimciği histolojisi [37].

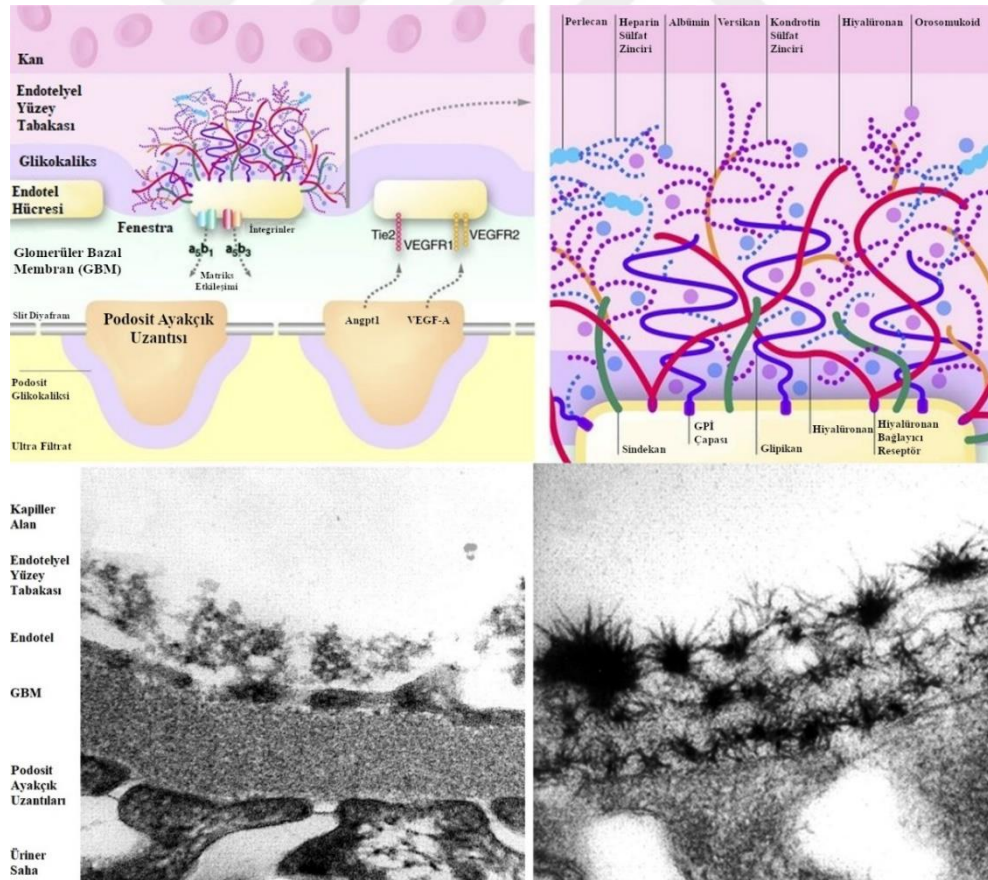
Glomerülün etrafında visseral ve paryetal olmak üzere iki yapraktan oluşan Bowman kapsülü bulunur. Bu iki yaprak arası üriner boşluk olarak adlandırılır ve filtrasyon işlemi buraya doğru gerçekleşir. Bowman kapsülünün visseral yaprağı glomerül üzerine sıkıca yerleşmiş olarak görülür ve podosit olarak bilinen özel morfolojiye sahip glomerüler visseral epitel hücrelerinden oluşur. İki yaprağın birbiriyle devamlılık gösterdiği arteryal kutuptan itibaren tek katlı yassı tipte glomerüler paryetal hücreler başlar ve üriner kutba kadar devam eder. Glomerül ile glomerül üzerine yerleşen Bowman kapsülünün visseral yaprağı arasında, bu iki yapının hücreleri tarafından sentezlenen ve glomerüler bazal membran (GBM) adı verilen bir membran yapısı bulunur. Bu membran arteryal kutupta paryetal hücrelerin bazal membranı olarak devamlılık gösterir.

Böbrek cisimciği içerisindeki glomerüler kapillerleri oluşturan glomerüler endotel hücreleri, Bowman kapsülünün visseral yaprağını oluşturan podositler ve ikisi arasında bulunan GBM'nin bir araya gelmesiyle glomerüler filtrasyon bariyeri adı verilen ve filtrasyon işlemini gerçekleştiren yapı oluşmaktadır.

2.3. Glomerüler Filtrasyon Bariyeri

2.3.1. Glomerüler Endotel Hücreleri

Filtrasyon bariyerindeki ilk set glomerüler endotel hücreleri tarafından oluşturulur. Glomerüler kapillerleri oluşturan bu özel endotel hücreleri, 60-80 nm transselüler sitoplazmik açıklıklar içeren fenestralı tip endoteldir [38]. Diğer delikli tip kapillerlere kıyasla, glomerülde bulunan endotel hücrelerindeki açıklıklar hem sayıca daha fazla hem de ebat olarak daha büyüktür. Ayrıca bu açıklıklar diyafram adı verilen ve açıklığı örten bir yapı içermez. Toplam yüzey alanının %20'sini oluşturan bu açıklıklar filtrasyon işleminin hızlı olmasını sağlar [39]. Bu özellikleri sebebiyle ilk dönem araştırmalarda endotel hücrelerinin filtrasyon işlemine katkı sağlamadığı düşünülse de yapılan çalışmalar aksini göstermiştir [38]. Endotelin yüzeyi delikli bölgelere uzanacak şekilde glikokaliks adı verilen negatif şarjlı bir örtüyle kaplıdır. Endotel hücreleri tarafından üretilen bu örtü çalılık benzeri bir yapı teşkil eder (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: Glomerüler filtrasyon bariyeri ve glomerüler bazal membranın şematik (üstte) ve elektron mikroskopik gösterimi (altta) [4].

Endotel üzerindeki yüzey örtüsü temel olarak proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar gibi glikozillenmiş proteinlerden oluşmaktadır [40]. Plazma proteinlerinin de bu yapıya adsorbe olmasıyla birlikte endotelyal yüzey tabakası adı verilen ve 200 nm'den daha kalın olan bir bariyer oluşmuş olur [41]. Böylece endotel hücreleri üzerlerindeki tabaka sayesinde filtrasyon sürecinin ilk süzme işlemini gerçekleştirir. Bu yüzey tabakasının aynı zamanda kapiller içindeki duvar kesme (shear) gerilimini ölçen bir sensör olarak işlev yaptığı ve endotel hücrelerinde gerekli sinyalizasyonu başlattığı görülmüştür [42]. Endotel hücreleri de bu gelen sinyaller üzerinden glomerüler kapillerlerin kasılma durumunu düzenleyen ve diğer glomerüler hücreleri uyuracak vazomotor faktörleri salgılayan bir düzenleyici olarak işlev yapmaktadır [43, 44]. Bu vazomotor faktörlerden en önemlisi olarak Endotelin-1 ve nitrik oksit (NO) görülmektedir. Tüm bu sebeplerle hem endotel hücrelerinin hem de endotel hücreleri üzerindeki tabakanın sağlıklı olması filtrasyon işleminin sorunsuz yürütmesi için elzemdir [45].

2.3.2. Glomerüler Bazal Membran

Glomerüler filtrasyon bariyerinin ikinci elemanı GBM'dir. Bu membran endotel ve podosit hücreleri tarafından ortaklaşa üretilmekte olup toplamda 144 farklı protein içermektedir [46]. En çok bulunan proteinler kollajen (tip I, IV, VI ve XVIII), laminin ($\alpha 5$, $\beta 2$ ve $\gamma 1$), nidogen-1 ve heparan sülfat proteoglikanlarıdır [47]. En temelde, sağladığı hücre-matriks ilişkisiyle GBM podositleri ve endotel hücrelerini bir arada tutmakta ve filtrasyon bariyerinin stabil halde kalmasını sağlamaktadır [39]. Bununla birlikte GBM pasif bir destek elemanı olmayıp, fibröz ve katmanlı kafes yapısıyla oluşan heterojen boyutlardaki açıklıklar sayesinde filtrasyon işleminde de rol almaktadır. Ayrıca salgılanan faktörler ve pro-anjiyogenik ligandlar için bir havuz oluşturarak podositler ve endotel hücreleri arasındaki hücreler arası etkileşimi sağlamaktadır [48, 49].

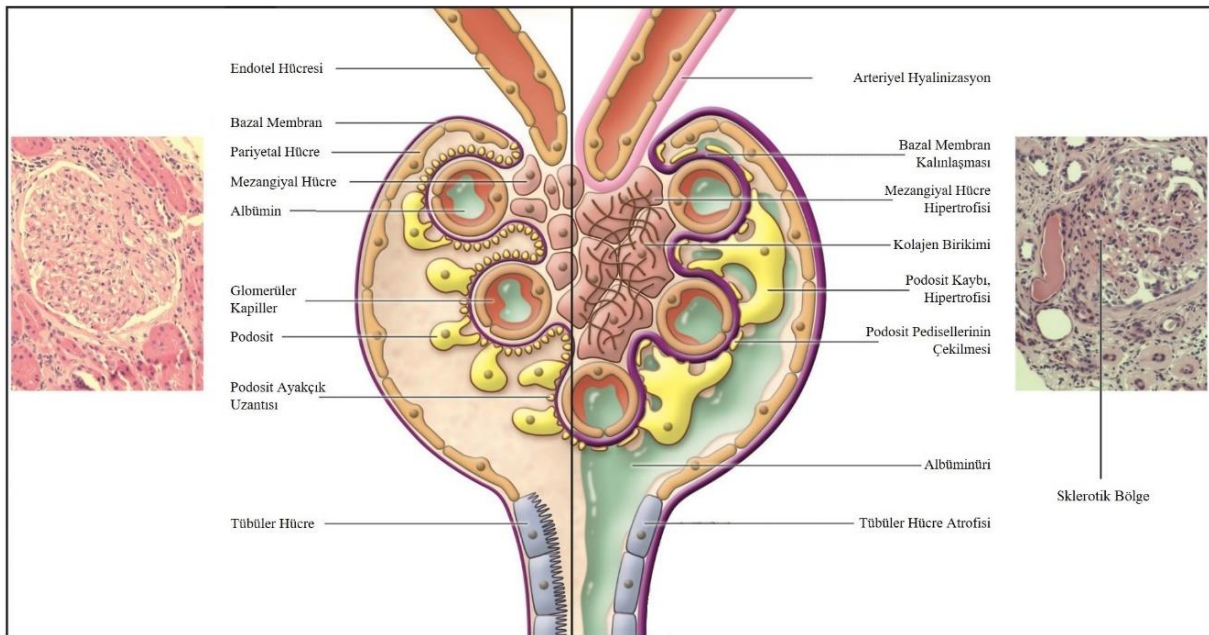
2.3.3. Glomerüler Visseral Epitel Hücreleri / Podositler

Filtrasyon bariyerinin son ve en kritik elemanı son derece farklılaşmış olan ve bölünebilme kapasitesi olmayan podositlerdir [50]. Gelişmiş ultrastrüktürleri sayesinde GBM'yi ürener taraftan pedisel adı verilen ayakçık uzantılarıyla sararlar [51]. Pediseller integrin ve distroglikan proteinleriyle GBM'ye tutunurlar [52]. Podositin bazal kompartman olarak bilinen bu kısmı GBM'yle ilişkiyi sürdürür. Komşu podositlerin pediselleri birbirleriyle ilişki kurarak slit diyafram adı verilen özelleşmiş bağlantı kompleksini oluştururlar ve filtrasyon bu yarıklardan gerçekleşir. Bu diyafram yapısı nefrin, nephrin, podocin ve FAT 1/2 gibi proteinlerden oluşur [53]. Slit diyafram yapısı CD2AP ve ZO-1 gibi proteinler aracılığıyla pediselin içerisinde

sinaptopodin, alfa-aktinin 4 gibi özel proteinler içeren aktin iskelete bağlıdır [54]. Podosit aktin iskeletinin statik bir yapı olmadığı, slit diyaframdaki yüzey proteinlerinden alınan sinyallerin bu bağlantı proteinleri tarafından sitoplazmik kısma aktarıldığı ve pedisel yapısını düzenleyip dönüştürdüğü düşünülmektedir [55, 56].

2.4. Diyabetik Nefropati

Diyabetik hastaların %20-40'ı, geçmeyen albüminüri ve düşen glomerüler filtrasyon hızıyla teşhis edilebilen diyabetik nefropati (DN) hastalığına yakalanmaktadır [57]. Diyabetin böbrekte oluşturduğu hasarın odağında glomerüller bulunmaktadır. Yüksek glikoz seviyesi filtrasyon bariyerinin tüm bileşenlerinde ve glomerül içindeki mezengiyal hücrelerde belirli patolojilere sebep olmaktadır (Şekil 2-4). Bu patolojilerden bazıları GBM kalınlaşması, mezengiyal matriks artışına ve mezengiyal hücre çoğalmasına bağlı olarak glomerül hipertrofisi, endotel hücrelerinin ve fenestralarının kaybı ile podosit hücre hasarıdır. Ayrıca glomerüler kapillerlerin genişlemesi, arteriyel hyalinizasyon ve glomerüloskleroz görülmektedir. Bu değişiklikler DN'nin erken belirteçleri olarak kullanılırken süreç içerisinde bu hastaların böbrek fonksiyonlarında azalma meydana gelmektedir [58]. DN'nin ilerleyen aşamalarında birçok glomerül çoğunlukla dağınık (diffuse) bazen de nodüler olmak üzere glomerüloskleroza uğramaktadır.



Şekil 2-4: Diyabetik nefropatide meydana gelen patolojiler [59].

Hem ışık mikroskopik düzeyde hem de ultrastrüktürel düzeyde meydana gelen bu patolojilerin temelinde glomerül içerisindeki hücrelerin hasar kaynağından primer olarak etkilenmelerinin yanı sıra birbirleri arasındaki moleküler etkileşimin bozulması yatmaktadır. Öncelikle glomerüler hücrelerde oluşan primer hasarlar ele alınacak, akabinde ise temel hücreler olan podoisit ve endotel arasındaki etkileşim açıklanacaktır.

2.4.1. Diyabetik Nefropatide Endotel Hücre Hasarı

Diyabet hastalığında, vücuttaki diğer endotel hücreleri gibi [60] glomerül içerisindeki endotel hücreleri de yüksek glikoz seviyesinden zarar görür [61, 62]. Buna rağmen endotel hücrelerinin diyabet patolojisindeki yeri bugüne kadar ayrıntılı olarak ortaya konulmuş ve anlaşılmış değildir. Eski çalışmalarda endotel hücreleri hakkında temel olarak düşünülen, görevini yerine getiremeyen ve ilk eleme işlemini başaramayan endotel hücrelerinin, hem podoisitlerde hem de tübüler hücrelerde strese sebep olduğu ve böylece glomerül patolojisini artırdığıdır [63]. Yakın zamanda yapılan çalışmalar ise endotel hücrelerindeki hasarın, glomerül içi etkileşimi bozarak glomerül patolojisine sebep olduğu yaklaşımını baz almıştır [8]. Çok yakın zamanda diyabet hastalarından alınan örnekler üzerinde yapılmış tek hücre RNA profili araştırması ise endotel hücrelerinin diyabetik nefropati gelişiminde koordinatör rolü oynuyor olabileceğine dair deliller ortaya koymuştur [64].

Yüksek glikoz seviyesine maruz kalan endotel hücreleri fenotipik bazı değişimler sergilemektedir. Endotel hücrelerinin birbirlerinden ayrışması ve hücre fenestralarının bozularak kaybolması bu değişimlerden bazılarıdır [65]. Endotelin hasar görmesiyle birlikte endotel hücrelerinin üzerindeki endotelyal yüzey tabakası incelmekte ve filtrasyon işleminin ilk andan itibaren bozulmasına sebep olmaktadır [66, 67]. Bu fenotipik değişimlerin altında endotel hücrelerinin hücre içi aktivitesinin bozulması yatmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS) üretimindeki artışın [68] ve eNOS'un inaktifleşmesinin [69, 70] endotellerde fonksiyon kaybına yol açtığı düşünülmektedir. Böylece bu kapillerlerde üretilen NO miktarı azalmaktadır. NO sadece endotel hücreleri için değil, glomerülün genel fonksiyonu için de son derece önemli bir faktördür [71]. Mitokondriyal disfonksiyon gösteren bu endotel hücreleri apoptozla kaybedilmektedir.

Diyabet durumunda vücuttaki endotel hücrelerinin anjiyogenez açısından uyarıldığı bilinmektedir [72]. Glomerüler endotel hücrelerinin de anjiyogenik genler bakımından aktif

olduğu tespit edilmiştir [64]. Glomerülde oluşan hasarlar karşısında endotel hücreleri anjiyogenez sürecini başlatmaktadır. Bu süreç endotel hücrelerinin artan proliferasyon göstermesi ve endotelyal-mezenkimal dönüşüme (EMT) girmesiyle başlamaktadır [73]. EMT sürecine giren endotel hücrelerinde CD31 ve vasküler endotelyal kadherin miktarlarında azalma, α -SMA ve dezmin miktarlarında ise artma görülmektedir [65]. Hatalı veya tamamlanamayan anjiyogenez süreçlerinin glomerül içerisinde fibrotik alanlar oluşturmaya bağlı olarak diabetik nefropatinin ilerlemesine neden olduğu düşünülmektedir [64].

2.4.2. Diyabetik Nefropatide Glomerüler Bazal Membran Değişiklikleri

Filtrasyon bariyerinde ikinci set olan GBM'nin önemini gösteren birçok farklı doğumsal anomali mevcuttur. Bu anomali incelemelerinde GBM'deki moleküler eksikliklerin glomerül fonksiyonunda bozulmalara sebep olduğu gösterilmiştir [74, 75]. Bununla birlikte diyabet gibi glomerülde hasar oluşturan dışsal etkenlerin de GBM'de bozulmalara sebebiyet verdiği bilinmektedir. Diyabetik nefropatinin ilk ultrastrüktürel bulgularından birisi GBM kalınlaşmasıdır [76]. GBM'deki bu kalınlaşmanın sebebi ilk olarak GBM elemanlarının sentezlenme ve bozunuma uğrama hızındaki değişiklikler olarak varsayılmıştır. Fakat yakın zamandaki çalışmalar bu kalınlaşmanın glomerülü yeniden düzenleyebilmek için geçici bir adaptasyon olabileceği ihtimali üzerinde durmaktadır [77]. Kültür ortamında çalışılan podositlerin, yüksek glikoza maruz kaldıkları durumda tip IV kollajen sentezini artırarak matriks destekleyici (promatrix) bir fenotip sergiledikleri gözlemlenmiştir [78, 79].

2.4.3. Diyabetik Nefropatide Podosit Davranışı

Glomerüldeki en zayıf halka podositlerdir. Son derece gelişmiş bir morfolojiye sahip olan podositler glomerülde oluşan stres karşısında bu gelişmiş morfolojisini kaybetmeye başlar. Slit diyafram bağlantılarının bazalden apikale doğru yer değiştirmesi sonrası pedisellerin geri çekilmesi şeklinde tabir edilen bir reaksiyon gösterirler [80]. Stres sebebinin devam etmesi durumunda podositler bazal membrandan kopma veya apoptoza uğrama yoluyla kaybedilmektedir [11]. Podosit kaybı, glomerül kaybıyla başlayıp nefronun tümüyle fonksiyonunu kaybetmesine sebep olan süreci başlatabilmektedir [81]. Podositlerin gelişmiş ultrastrüktürünü kaybetmesinde epitelyal mezenkimal dönüşümün (EMT) etkili olduğu düşünülmektedir [82]. Yüksek glikoz seviyesinin podositlerdeki nefrin ve ZO-1 gibi slit diyafram proteinlerinin ekspresyonunda azalmaya; dezmin, vimentin, Snail ve MMP9 gibi mezenkimal hücre belirteçlerinde artmaya sebep olduğu bilinmektedir [82, 83].

Diyabet podositler üzerinde hem direkt hem de dolaylı olarak hipertrofik bir etki gösterir [84, 85]. Bu durum, glomerüler yumağın genişlemesini dengeleyebilmek, kaybedilen podositlerin ve geri çekilen pedisellerin sebep olduğu çıplaklaşmış alanları örtebilmek için meydana geldiği düşünülmektedir. GBM üzerindeki çıplaklaşmış alanlar hem protein kaçaklarına hem de glomerüloskleroza sebep olabilmektedir.

Glomerülde oluşan hasarın direkt podosit hasarı sonucunu vermediği, podositlerin streslere karşı denge sağlayabilecek iç mekanizmaları bulunduğu düşünülmektedir [86]. Çoğu hücrede olduğu gibi, podositlerde de, hasar ilk olarak otofajik reaksiyona sebep olmakta ve hücre, hasarların bertarafı yoluna gitmektedir [87, 88]. Diğer hücrelerden farklı olarak podositlerde bazal otofajik aktivitenin yüksek olduğu bilinmektedir [88, 89]. Yani diğer hücelere kıyasla podositler, işlevselliğini sürdürebilmek için otofaji yolağını her daim daha yüksek seviyede kullanmaktadır. Bu bazal otofajinin durdurulmasının podosit hasar ve kaybı yoluyla proteinüriye, ilerleyici glomerüloskleroza ve böbrek yetmezliğine sebep olduğu gösterilmiştir [90, 91]. Yüksek glikoz seviyesinin (YGS) podositler üzerindeki etkisine dair ise çelişkili bulgular mevcuttur: bir çalışmada YGS'nin podositlerde otofajiyi artırdığı ve hücreleri apoptozdan koruduğu gösterilmişken [92] diğer bir çalışmada YGS'nin podositlerdeki otofajiyi baskıladığı bulgulanmıştır [93]. YGS durumunun glomerüler hücrelerdeki otofaji üzerine etkilerinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte otofajinin hem podositler hem de endotel hücreleri için önemli olduğu kesindir ve bu alanda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4.5. Diyabetik Nefropatide Podosit - Endotel Etkileşimi

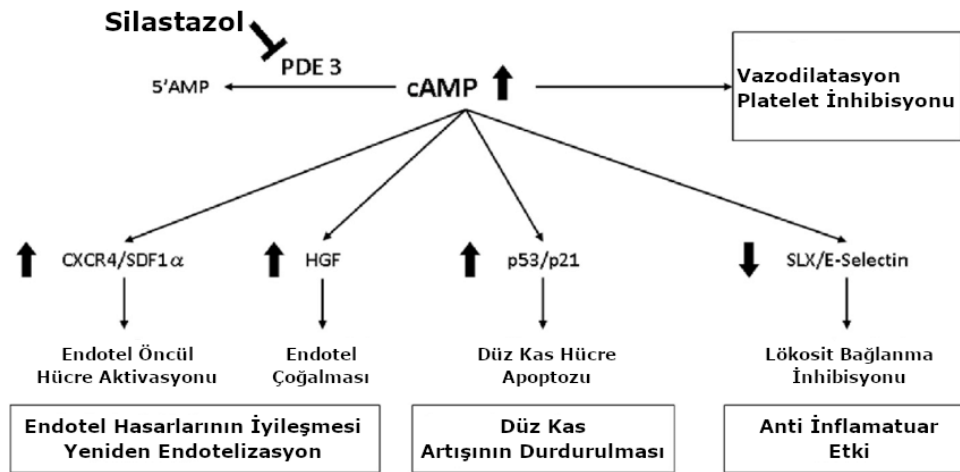
Glomerül filtrasyon bariyerini oluşturan podosit ve endotel hücreleri çok geniş bir yelpazede etkileşim içerisinde bulunur. Bu etkileşim faktörlerinin önde gelenlerinden dördü VEGF-A, SDF-1, Anjiyopoetin 1 ve 2'dir [12, 13, 94]. Bu sinyal yollarından VEGF yolağı çokça çalışılmış bir yolak olup glomerül fonksiyonu için olmazsa olmazdır. Birçok farklı izoformu bulunmakla birlikte glomerül içinde en etkin olanının VEGF-A olduğu bilinmektedir. Podositlerden salınan VEGF-A'nın reseptörü olan VEGFR2 endotel hücreleri üzerinde bulunur ve uyarılması endotel hücrelerinde korunma, çoğalma, farklılaşma ve göç hareketine sebep olur [95]. Gelişim aşamasından başlayarak ömür boyu salınımının devam ettiği, salınımındaki herhangi bir azalmanın endotel duvarındaki fenestra yapılarının ortadan kalkmasına sebep olduğu gösterilmiştir [96]. Fakat bu verilerin aksine literatürde VEGF-A blokasyonunun

albüminüriyi azalttığı bilgisi de mevcuttur [97, 98]. Bütün bunlar glomerülde kritik bir VEGF-A dengesinin bulunması gerektiğini göstermektedir.

SDF-1 kök hücre yolaklarıyla ilgili olduğu bilinen bir kemokin olup glomerülde podositlerden salgılanmaktadır. SDF-1'in reseptörü olan CXCR4 ise endotel hücrelerinde ve paryetal epitel hücrelerinde eksprese olmaktadır [99, 100]. Glomerüler kapillerlerin oluşumunda endotel hücrelerini yönlendirdiği bilinmektedir [99]. Aynı zamanda paryetal epitel hücrelerinin pasif konumda tutulmasını sağladığı düşünülmektedir [101]. Son olarak Anjiyopoetin 1 (Angpt1) ve Anjiyopoetin 2 (Angpt2) ise bütün vücutta olduğu gibi glomerülde de kapillerlerin stabilitesi için antagonistik olarak çalışan iki faktördür [8, 102]. Podositler tarafından üretilen bu faktörlerin her ikisi de endotel üzerinde eksprese olan Tie2 reseptörüne bağlanarak etki gösterir. Angpt1 glomerüler kapillerlerin olgunlaşması ve stabilitesi yönünde uyarım sağlarken Angpt2 kapillerlerde destabilizasyona neden olmaktadır [103]. Aynı reseptör üzerinden etki göstermeleri sebebiyle dokudaki Angpt1/Angpt2 oranı diyabetik nefropati gelişiminde önem arz etmektedir [104].

2.5. Silostazol ve Etki Mekanizmaları

Antitrombotik ve vazodilatör etkiye sahip onaylanmış ilaçlardan biri olan Silostazol temel olarak intermitan kladikasyon tedavisinde kullanılmaktadır [105, 106]. Silostazol'un hücre içi sinyal molekülü cAMP'yi hidrolize eden fosfodiesteraz III enzimini inhibe ettiği bilinmektedir [107]. Böylece damar yapısı ve plateletlerde cAMP artışına sebep olarak hem platelet çökmesini engellemekte hem de periferik vazodilatör etki göstermektedir (Şekil 2-5) [108].



Şekil 2-5: Silostazol etki mekanizmasının şematik gösterimi [109].

Silostazolün hücre içinde cAMP'yi artırmasının endotel hücreleri üzerinde birçok koruyucu ve indükleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir. Endotel hücrelerini serum kıstıtlılığı ve yüksek glikoz durumlarında apoptoza uğramaktan koruduğu tespit edilmiştir [110, 111]. Silostazol'un artmış cAMP miktarıyla eNOS fosforilasyonunu artırarak nitrik oksit miktarında artmaya sebep olduğu ve endotel hücrelerinin tüp oluşturmalarını desteklediği görülmüştür [112]. Ayrıca silostazol'un, iskekiye uğrayan kas hücrelerinden salınan VEGF-A miktarını artırdığı bilinmektedir [113].

2.6. Silostazol ve Diyabetik Nefropati

Silostazol intermitan klidasyon tedavisinde kullanılmaya devam ederken birçok yeni çalışma, Silostazol'un diyabetik nefropati, diyabetik nöropati ve inme gibi farklı hastalıklarda da etkili olabileceğine dair bulgular elde etmiştir [114–116]. İntermitan klidasyon ve serebral enfarktüs (inme) gibi hastalıklardaki olumlu etkileri, silostazol'un antitrombotik ve vazodilatör etkisine bağlanırken diyabetik nöropati ve diyabetik nefropati gibi hastalıklardaki etki mekanizması henüz yeterince açıklanabilmiş değildir. Bu amaçla yapılmış birkaç çalışma Silostazol'un glomerüllerde TGF-B, NF-KB ve TNF-a gibi faktörleri azaltarak reaktif oksijen üretimini baskıladığı ve böylece glomerüllerin yüksek glikoz seviyesinin olumsuz etkilerinden korunduğunu ileri sürmüştür [114, 117–120]. Bu çalışmalardan birinde de mezengiyal hücrelerle *in vitro* yapılan deneyler silostazol'un bu hücrelerde anti-apoptotik etki gösterdiğini ortaya koymuştur [117]. Fakat glomerül gibi farklı hücre tiplerinden oluşan ve kompleks bir etkileşime sahip yapı için bu mekanizma incelemeleri eksik ve yetersiz kalmıştır.

Silostazol'un, hücre kaderi için kritik olan otofaji yolları üzerindeki etkileri ise son derece az çalışılmış bir konudur. Bugüne kadar yapılmış bu az sayıdaki çalışma, silostazol'un otofajiyi indüklediğini göstermiştir [121, 122]. Daha çok nöronlarda yapılan bu incelemeler, silostazol'un diyabetik nöropatideki olumlu etkilerinin bir mekanizması olarak değerlendirilmektedir. Silostazol'un glomerüler hücrelerdeki otofajiye etkileri ve diyabetik nefropati üzerindeki olumlu etkilerinde otofajinin nasıl bir rol oynadığı ise araştırılmamıştır.

3. YÖNTEM

Ex-vivo olarak tasarlanmış bu tez çalışmasında böbreklerin elde edilmesi Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 24.08.2020 tarihli ve 2020/88 sayılı onayı ile yine aynı üniversitenin Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda 19.07.2022 tarihinde gerçekleştirildi. Alınan böbrekler İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki Doku Kültürü ve Histoloji laboratuvarlarında çalışıldı. Kültür sonrası doku numuneleri üzerindeki incelemeler yine aynı üniversitenin Işık ve Elektron Mikroskopi Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

3.1. Gereçler

3.1.1. Alet ve Teçhizat

Giyotin

Hayvan Cerrahi Seti

Penset

Makas

50 ml'lik falkon

Steril Serolojik Pipet 10 ml (Jet Biofil: GSP-010-010)

Cam Petri

Bistüri

Jilet

Enjektör (10 ml'lik)

Elekler (Sieves - Alfa Aesar AA39999ON, AA39996ON, AA39990ON, AA39991ON)

24 Kuyucuklu Doku Kültür Tabağı (Biofil: TCP 011024)

Eppendorf Tüpleri

Mikropipet Seti (Eppendorf)

Mikropipet Uçları

Lam

Lamel

Bakır Grid (EMS, G100-Cu)

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Hanks'ın Dengeli Tuz Çözeltisi (HBSS)

Sığır Serum Albümin (BSA)

Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu (DMEM/F12) (Thermo fisher: 11320074)

Fetal Sığır Serum (FBS: Hyclone: HY30160.03)

Tris/EDTA Solüsyonu

Fosfatla Tamponlanmış Tuz Solüsyonu

Nefrin Antikoru (Abcam – ab216341)

WT1 Antikoru (Abcam – ab212951)

Synaptopodin Antikoru (Abcam – ab224491)

CD31 Antikoru (Novusbio – NB100-64796)

Ki67 Antikoru (Biorbyte – orb389335)

LC3-I Antikoru (Biorbyte – orb33328)

Vimentin Antikoru (Abcam – ab92547)

Kesilmiş-Kaspaz-3 Antikoru (St John's Laboratory – STJ90005)

Gluteraldehit (Merck Millipore: 1.04239.0250)

Osmium Tetraoksit (Merck Millipore: 1.00983.2511)

Araldit Embedding Medium Kit

Etil Alkol %96 (Alkomed: CAS 64-17-5)

Propilen Oksit (Merck: 8.07027.1000)

Toluidin Mavisi (Merck: 7471451)

Uranil Asetat Dihidrat (Merck: 4087843)

Kurşun Sitrata (Sigma 15326-100G)

Sodyum Sitrata (Merc: 1.06448.1000)

Sitrik asit Monohidrat (Merc: 100244)

Hematoksilen (Invitrogen 00-8011)

Eozin (Merck: 1.15935)

Entellan (Merck 1.07961)

Lityum karbonat (Merck: 105671)

Toluen (Merck: 1.08323.2500)

Paraformaldehit (Merck: 1.04005.1000)

Triton X-100 (Fisher BioReagents BP151)

SDF-1 Elisa Kit (Elabscience E-EL-R2495)

VEGF-A Elisa Kit (Elabscience E-EL-R2603)

Angpt 1 Elisa Kit (Elabscience E-EL-M3014)

Angpt 2 Elisa Kit (Elabscience E-EL-M0098)

3.1.3. Cihazlar

Sterile Edilmiş Sınıf II Laminar Havalandırılmalı Kabin (Esco: Class II)

İnkübatör (Thermo Scientific, Heracell 150i)

Santrifüj (Eppendorf: 5810 R)

Buzdolabı (Arçelik)

Elektrikli Pipet Pompası (Ratiolab: Accupetta)

Etüv (Heraeus)

Mikrotom (Thermo Scientific Microm hm430)

Ultramikrotom (Leica, EM UC7)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Işık mikroskobu (Olympus BX61)

Kamera (Olympus DP72)

Elektron Mikroskobu (Jeol Jem-1011)

Distile Su Cihazı (Sartorius Stedim Biotech: arium pro VF)

Mikroplate Okuyucu (Allsheng AMR-100 Microplate Reader AS-16050-00)

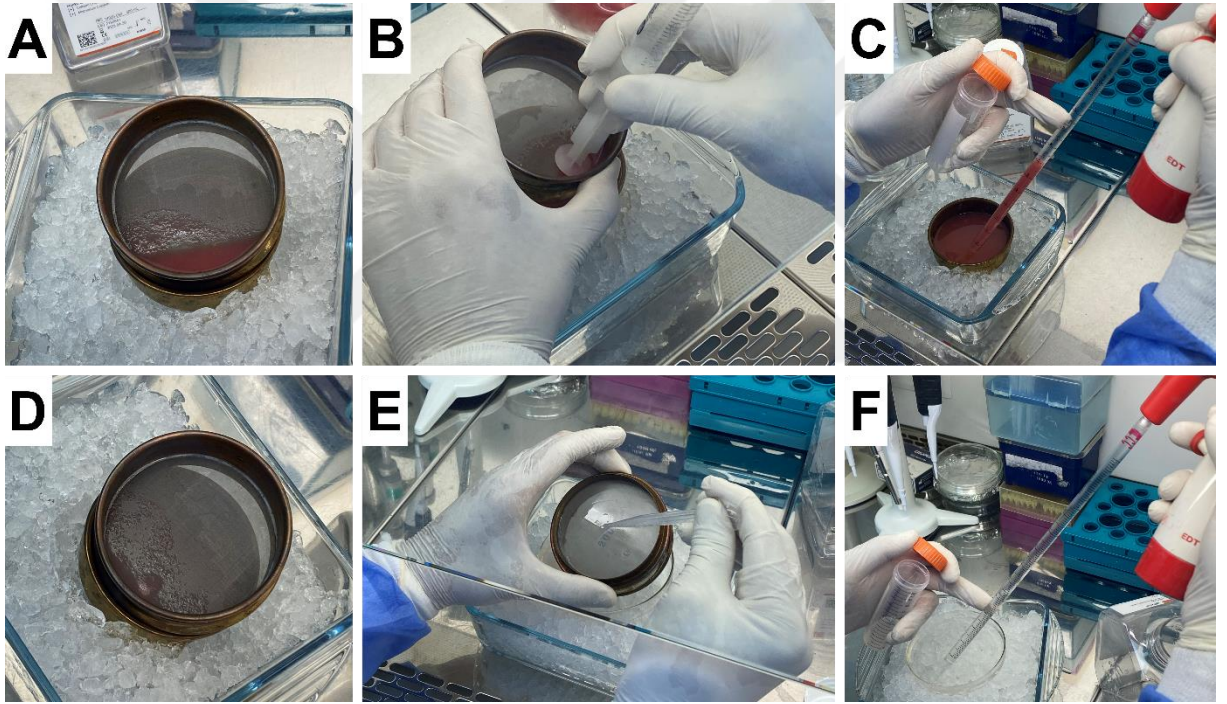
3.2. Nefrektomi

Ortalama 150 – 200 g ağırlığındaki 8 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan dekapitasyon yoluyla kurban edildi. Sırayla dekapite edilen sıçanların batin bölgeleri, tüyleri iç organlara bulaşmayacak şekilde titizlikle ve hızlıca açıldı. İç organlar kaldırılarak steril penset ve makas yardımıyla önce sağ sonra sol böbrek kesilerek çıkarıldı. Çıkarılan böbrekler buz içinde soğutulmuş, %1'lik (v/v) amfoterisin içeren HBSS ile dolu 50 ml'lik falkona alındı ve yine buz içerisinde hızlıca doku kültürü laboratuvarına transfer edildi.

3.3. Glomerül İzolasyonu

Doku kültürü laboratuvarına nakledilen böbrekler glomerül izolasyonuna tabi tutuldu [123]. Bu amaçla sınıf II steril laminar havalandırmalı kabin içerisine yerleştirilen steril bir kabın içerisine buz konuldu ve böbrekleri içeren falkon bu buza aktarıldı. Buz üzerine yerleştirilen cam petri kabına önce 5 ml HBSS konuldu ve böbrekler sırasıyla falkondan çıkarılarak kapsüllerden ve böbrek üzerindeki yağ dokusundan arındırıldı. Daha sonra böbrekler bistüri yardımıyla mid-sagital bölgeden ikiye ayrıldı. Yine bistüri yardımıyla medulla bölgeleri uzaklaştırılarak korteks bölgeleri kalacak şekilde diseksiyon yapıldı. Bu işlem tüm böbreklere uygulandıktan sonra korteks bölgesi bakımından zengin doku birikimi yeni bir petri kabına aktarıldı ve bu petri kabı üzerinde tek taraflı jilet kullanılarak jelimsi kıvama gelen kadar parçalandı. Parçalanmış bu doku kitlesi spatula yardımıyla petri üzerinden alınarak %1'lik BSA çözeltisiyle ıslatılmış 180 µm'lik elek üzerine konuldu (Şekil 3-1A). 10 ml'lik enjektörün ters tarafındaki dokulu kısım kullanılarak ve aralıklı olarak HBSS yardımıyla yıkanarak bu korteks kitlesi elekten geçirildi (Şekil 3-1B). Elekten geçerek alttaki kapta toplanan sıvı 20G iğne ucu takılmış 10 ml'lik enjektörlere çekilerek toplandı. Daha sonra bu enjektörlerdeki sıvı, yine önceden %1'lik BSA ile ıslatılmış 150 µl'lik elek üzerine bırakıldı ve süzülmesi sağlandı. Elekten geçen sıvı toplanarak 50 ml'lik bir falkona aktarıldı (Şekil 3-1C). Daha sonra bu falkondaki sıvı son olarak, yine %1'lik BSA ile ıslatılmış 75 µm'lik elek üzerine aktarıldı ve sıvının süzülmesi sağlandı. Bu aşamada glomerüller elek üzerinde toplanmış olduğu için doku parçalarından

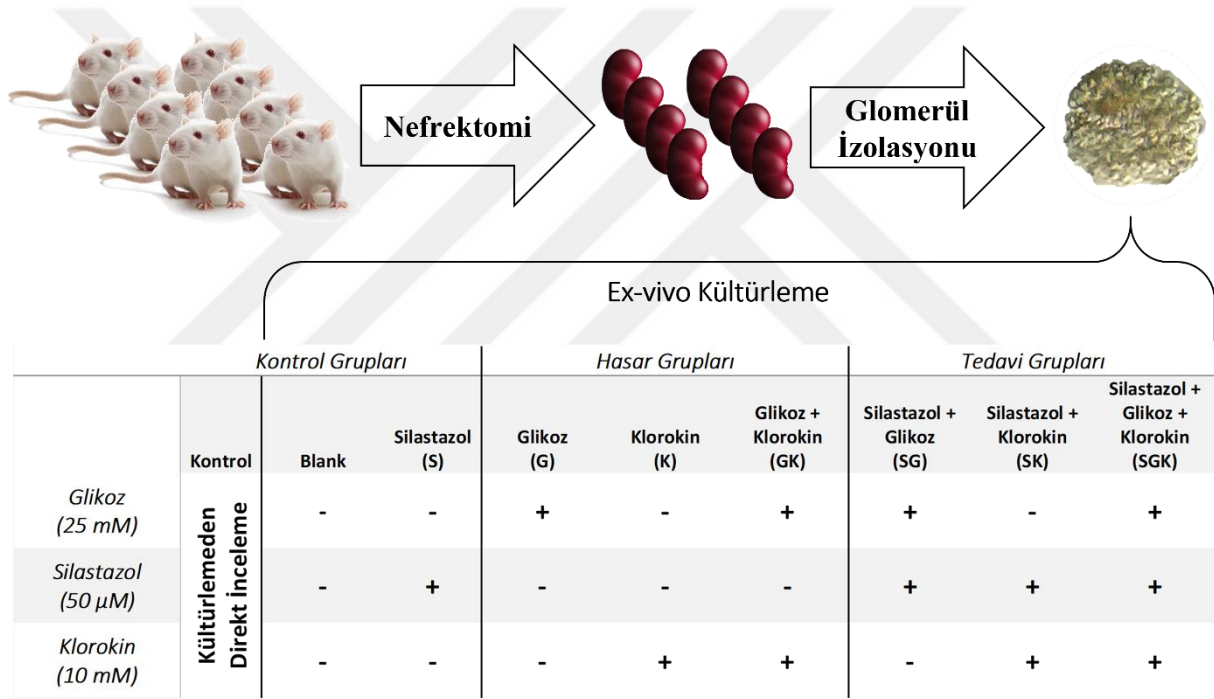
kurtulmak üzere eleğin üzeri bol miktarda HBSS yardımıyla yıkandı (Şekil 3-1D). Daha sonra 75 µm'lik elek bir petri üzerinde ters çevrildi ve DMEM F12 + %10 FBS medyumunu ile ters taraftan yıkanarak glomerüller elekten toplandı (Şekil 3-1E). Petri içindeki sıvı 50 ml'lik falkona aktarılarak 1 dakika boyunca 185g ile santrifüj edildi (Şekil 3-1F). Süpernatant atıldıktan sonra taze HBSS ile aynı şartlar altında yıkama işlemi yapıldı. Yıkamadan sonra pellet 14 ml DMEM F12 + %10 FBS medyumunu içerisinde dağıtıldı [124] ve bu karışımdan 20 µl lam üzerine alınarak glomerüllerin ve tübüllerin sayımı yapıldı (Şekil 4-1). Toplam glomerül sayısı ve glomerül saflığı tespit edildikten sonra her bir kuyucuğa 500 µl olacak şekilde glomerüller 24 kuyucuklu plate'e dağıtıldı. Geriye kalan 2 ml içindeki glomerüller kültürleme yapılmadan direkt olarak ışık ve elektron takibine alınarak Kontrol grubu oluşturuldu.



Şekil 3-1: Glomerül izolasyonu aşamalarından görüntüler. Korteks bölgeleri toplanan böbrekler jilet yardımıyla jelimsi kıvama getirilene kadar parçalanan doku kitlesinin elek üzerine bırakılması (A). Doku kitlesini elekten geçirmek üzere 10 ml'lik şırınganın kullanılması (B). Elek altında toplanan sıvının falkonda toplanması (C). Eleklerden geçirilerek parçalanan doku kitlesinin son elek üzerine bırakılması ve HBSS yardımıyla yıkanması (D). Elek üzerinde toplanan glomerüllerin cam petriye aktarılması (E). Petri üzerinde toplanan glomerüllerin toplanarak santrifüj edilmek üzere falkona aktarılması (F).

3.4. Ex-Vivo Kültürleme

Ex-Vivo kültürleme için her biri 3 örnek içerecek şekilde 8 grup planlandı. Hiçbir etken maddenin eklenmediği grup *Blank* grubunu oluştururken sadece silastazolün eklendiği grup Silastazol (S) grubunu oluşturdu. Hasar oluşturmak için kullanılan glikoz ve klorokin etken maddeleriyle sırasıyla Glikoz (G), Klorokin (K) ve Glikoz + Klorokin (GK) grupları oluşturuldu. Silastazolün eklendiği tedavi grupları ise sırasıyla Silastazol + Glikoz (SG), Silastazol + Klorokin (SK) ve Silastazol + Glikoz + Klorokin (SGK) grupları oldu (Şekil 3-2). Etken maddelerin gruplara göre eklenmesinden sonra plate hafifçe çalkalanarak etken maddelerin medyum içerisinde tam olarak dağılması sağlandı ve sonrasında plate inkübatöre alınarak 36 saat süreyle 37°C - %5 CO₂ şartları altında inkübe edildi.



Şekil 3-2: Deney dizaynı

3.5. Numunelerin Elde Edilmesi

İnkübasyon süresi dolduktan sonra plate inkübatörden çıkarıldı ve kuyucuklardaki sıvılar ayrı ayrı 1.5 ml'lik eppendorf'larda toplandı. Toplanan glomerüller 185g'de 1 dk santrifüj edilerek pellet haline getirildi. Medyumdan oluşan süpernatant ayrı eppendorf tüplere alınarak ELISA

incelemesi için -80°C'ye kaldırıldı. Pellet PBS yardımıyla çözdürülerek ışık ve elektron mikroskopu takibi için 2'ye ayrıldı.

3.5.1. Işık Mikroskopu Takibi

PBS içinde çözülmüş olarak bulunan glomerüller santrifüj yardımıyla pellet haline getirildi ve bu pelletin üzerine %4'lük paraformaldehit / PBS eklendi. 3 saatlik fiksasyon sonrası fiksatif uzaklaştırıldı ve PBS ile 30 dk'lık yıkama yapıldıktan sonra pellet ışık takibinde toplu halde kalması için agar / jelatin karışımı içinde donduruldu. Bunun için %2 agar / %2,5 jelatinden oluşan sıvıdan pellet üzerine 100 µl eklenerek glomerüllerin bu sıvı içerisinde dağılması sağlandı. Bu sıvı +4°C'de katı hale getirildikten sonra alkol serisinden geçirme işlemi yapıldı. Sırasıyla %70, %90, %96 ve %100 alkollerde bekletildikten sonra tolüene alındı. Bu aşamadan sonra parafine gömme işlemi yapılarak bloklar oluşturuldu.

3.5.2. Geçirimli Elektron Mikroskopu Takibi

Elektron mikroskopik incelemeler için ayrılan glomerüller PBS uzaklaştırıldıktan sonra fosfat tamponla hazırlanmış %2,5'lük gluteraldehite alındı ve 1 gece fikse edildi. Ardından fosfat tamponla yıkanan glomerüller ikincil fiksasyon için %1'lik ozmiyum tetraoksit solüsyonuyla muamele edildi. Ozmiyum tetraoksitin uzaklaştırılmasından sonra fosfat tamponla yıkama yapıldı ve santrifüj yardımıyla oluşturulan pellet, %2'lik agaroz ile karıştırılarak donduruldu. Oluşturulan bu glomerül blokları bisturi yardımıyla küçük parçalara ayrıldı ve sırasıyla %30, %50, %70, %80, %90, %96 ve üç kere %100 alkolden geçirilerek propilen oksite alındı. Ardından 1:3 ve 1:1 olacak şekilde aşamalı olarak araldit propilen oksit karışımlarından geçirilerek 3:1 oranındaki araldit propilen oksit karışımına alındı. Glomerül blokları bu karışımda 1 gece bekletildikten sonra saf araldite alındı ve 4 saat inkübe edildi. Daha sonra 2 gece 60°C'de bekletilmek üzere saf araldit içeren kapsüllere gömme işlemi yapılarak araldit bloklar oluşturuldu.

3.6. Histokimyasal İncelemeler

Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler 1 gece etüvde bekletildikten sonra tolüene alınarak kesitlerin parafinden arındırılması yapıldı. Sonrasında kesitler sırasıyla %100, %96, %90 ve %70'lik alkollerden geçirilerek distile suya indirildi. Bu şekilde hazırlanan kesitlere Hematoksilen & Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff & Hematoksilen (PAS&H) boyamaları yapıldı. Elde edilen boyanmış kesitler Olympus BX61 mikroskop ile görüntülendi.

ve Olympus DP72 kamerasıyla fotoğraflandı. Mezengiial alan genişlemesini kantitatif olarak değerlendirmek için her gruptan PAS&H boyamasına ait en az 10 fotoğraf Fiji uygulaması kullanılarak çalışıldı [125]. Bunun için fotoğraflara renk dekonvülyasyonu yapıldı ve buradan elde edilen PAS (+) alanlarda eşikleme uygulanarak PAS (+) alan hesaplandı. Daha sonra tüm alan hesaplanıp PAS (+) alanlar total alana bölünerek her glomerüle ait mezengiial alan oranı hesaplandı ve gruplar arası karşılaştırıldı.

3.7. Ultrastrüktürel İncelemeler

Ultramikrotom yardımıyla araldit bloklardan 40 – 60 nm kalınlığında ince kesitler alınarak bakır gridler üzerinde kurutuldu. Sırasıyla 45 dk uranil asetat ve 15 dk kurşun sitrat damlaları üzerinde bekletilerek kontrastlanan kesitler Jeol Jem-1011 model geçirimli elektron mikroskobunda incelenerek değerlendirildi. Morfometrik analiz için her gruptan 5 glomerülün 3 farklı periferik bölgesi Olympus Soft Imaging kamera sistemi ile fotoğraflandı. Fotoğraflar üzerinden yapılan ölçümler gruplar arası karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.8. İmmünfloresan Boyamalar

Parafin bloklardan pozitif şarjlı lam üzerine alınan 4 µm'lik kesitler gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Bu kesitler öncelikle 15 dk + 15 dk olacak şekilde tolüende bekletilerek parafinden arındırıldı ve sırasıyla 5'er dk 100°, 100°, 96°, 70°, 50° olacak şekilde inen alkol serisinden geçirilerek distile suya indirildi. Antikor üreticisinin tavsiye ettiği tamponlar kullanılarak mikrodalgada 10 kere 2 dk olacak şekilde ısıtılarak antijen geri kazanımı sağlandı. Lamaların bu tampon içerisinde soğuması beklendikten sonra kesitler 2 kere olmak üzere TBS ile yıkandı. Pappen yardımıyla çevresi çizilen dokular üzerine %5'lik BSA çözeltisi damlatılarak yapılan bloklama aşamasından sonra kesitlere primer antikorlar eklendi ve kesitler gece boyu (16 saat) nemlendirme haznesi içerisine yerleştirilmiş olarak +4°C'de bekletildi. Antikorlar uzaklaştırıldıktan sonra kesitler 3 kere olacak şekilde TBS ile yıkandı ve ardından 1/500 dilüsyona sahip goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 ve goat anti-mouse FITC antikorları karanlık şartlar altında uygulandı. Sekonder antikor ile 90 dk yapılan inkübasyondan sonra kesitler TBS ile 3 kere yıkandı ve DAPI'li kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatıldı [126]. İmmünfloresan boyamalarda WT1 (1:500), Nefrin (1:500), Synaptopodin (1:500), CD31 (1:400), Ki67 (1:400), LC3-I (1:400), Vimentin (1:400) ve Kesilmiş Kaspaz 3 (1:400) primer antikorları kullanıldı.

İmmünfloresan boyama sonuçlarının kantitatif olarak değerlendirilmesi için her gruptan en az 10 glomerül seçildi ve Fiji programında çalışıldı [125]. Nefrin, Sinaptopodin, CD31, LC3-I ve Vimentin boyamalarında immünfloresan pozitif alanlar eşiklemeyle ölçüldü ve total alana bölünerek oranlandı. WT1, Ki67 ve Kaspaz 3 boyamalarında ise pozitif hücrelerin sayımı yapılarak gruplar arası karşılaştırma yapıldı.

3.9. ELISA Ölçümleri

Kültüre edilen glomerüllerin medyumları toplandı ve çalışılana kadar -80°C’de saklandı. Bu medyumlar içindeki VEGF-A, SDF-1, Angiopoietin-1 ve Angiopoietin-2 miktarlarının ölçümü için enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) yapıldı. Ölçümler, kullanılan ticari kitlerin önerdiği protokoller takip edilerek mikropate okuyucu (Allsheng AMR-100 Microplate Reader AS-16050-00) ile belirlendi.

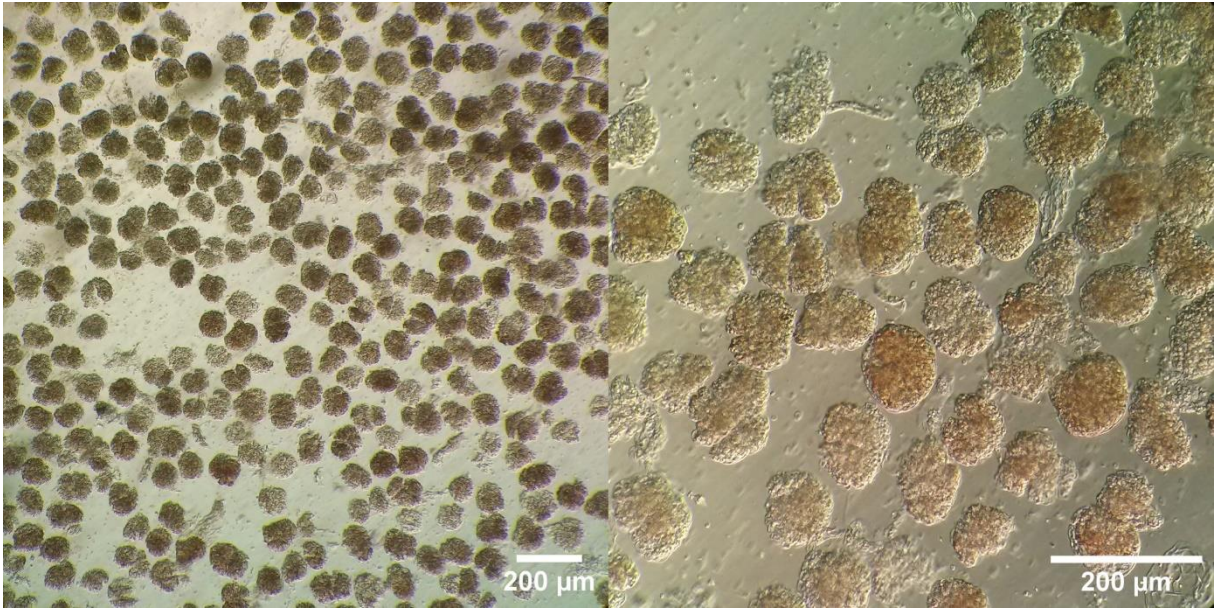
3.10. İstatiksel Analizler

İstatiksel analizler için GraphPad istatistik programı kullanıldı. Ortalama $\pm$ standart hata şeklinde ifade edilen veriler normal dağılıma uygunluk arz ettiği durumda (Shapiro Wilk normalite testi) tek yönlü varyans analizi (Tek Yönlü ANOVA) kullanılarak grupların ortalamalarının karşılaştırılması yapıldı. Anlamlı fark bulunması halinde gruplar arası değerlendirme için post-hoc Tukey testi kullanıldı. Normalliğin olmadığı veriler içinse parametrik olmayan Kruskal-Wallis testine başvurulurak gruplar arası anlamlılık incelendi [127].

4. BULGULAR

4.1. Glomerül İzolasyonu

Glomerül izolasyonu sonrası pellet halinde toplanan glomerüller medyum içerisinde dağıtıldıktan sonra karışımdan 20 µl alınarak lam üzerinde mikroskop yardımıyla incelendi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: İzole edilmiş glomerüllerin faz kontrast mikroskobuyla gösterimi.

Yapılan sayımda 259 glomerül ve 14 tübül yapısı tespit edildi. Bu verilerle glomerül saflık oranı, izole edilen toplam glomerül sayısı, böbrek başına izole edilen glomerül sayısı ve kuyucuk başına düşen glomerül sayıları hesaplandı. Glomerül izolasyonunda elde edilen %95’lik saflık yeterli olarak değerlendirildi [123].

$$\text{Glomerül Saflık Oranı} = \frac{\text{Glomerül Sayısı}}{\text{Glomerül} + \text{Tübül Sayısı}} \times 100$$

$$\text{Glomerül Saflık Oranı} = \frac{259}{259 + 14} \times 100 \cong \%95$$

İzolen Edilen Toplam Glomerül Sayısı

$$= \frac{\text{Numunedeki Glomerül Sayısı}}{\text{İncelenen Numune Hacmi}} \times \text{Toplam Numune Hacmi}$$

$$\text{İzolen Edilen Toplam Glomerül Sayısı} = \frac{259}{20} \times 13000 = 168.350 \text{ glomerül}$$

$$\text{Böbrek Başına İzole Edilen Glomerül Sayısı} = \frac{\text{İzole Edilen Toplam Glomerül Sayısı}}{\text{Kullanılan Böbrek Sayısı}}$$

$$\text{Böbrek Başına İzole Edilen Glomerül Sayısı} = \frac{168.350}{16} \cong 10.522 \frac{\text{glomerül}}{\text{böbrek}}$$

$$\text{Kuyucuk Başına Düşen Glomerül Sayısı} = \frac{\text{İzole Edilen Toplam Glomerül Sayısı}}{\text{Deney Kurulan Kuyucuk Sayısı}}$$

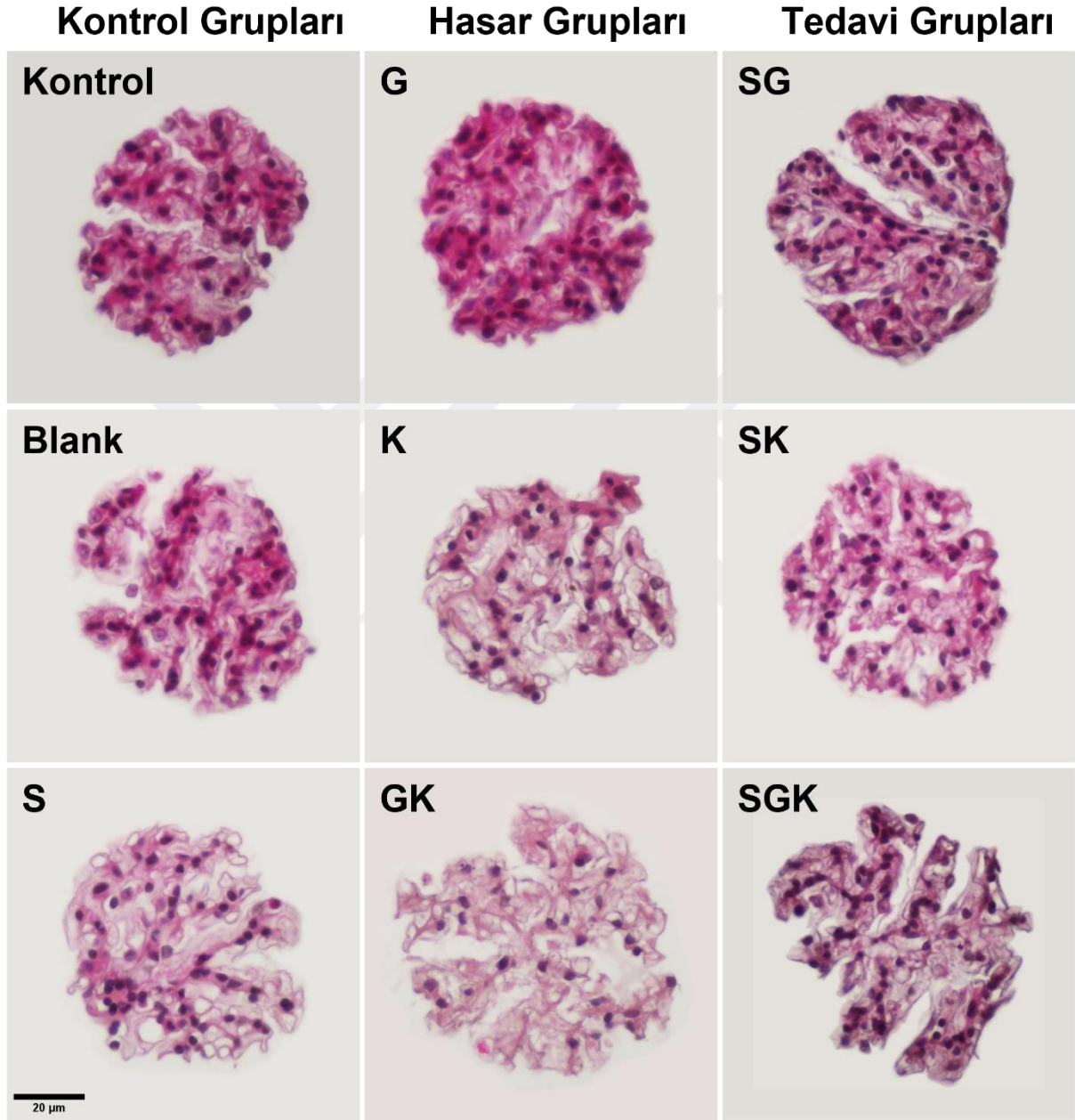
$$\text{Kuyucuk Başına Düşen Glomerül Sayısı} = \frac{168,350}{26} = 6475 \frac{\text{glomerül}}{\text{kuyucuk}}$$

4.2. Histokimyasal Bulgular

4.2.1. Hematoksilen & Eozin Boyama Bulguları

Elde edilen glomerüller Hematoksilen & Eozin boyamasıyla dejenerasyonlar açısından incelenerek karşılaştırıldı (Şekil 4-2). İzolasyon sonrası kültüre alınmadan direkt örneklenen Kontrol grubu glomerüllerinin yapı bütünlüğünü koruduğu dolayısıyla izolasyonun başarılı olduğu görüldü. İzolasyon sonrası herhangi bir etken madde kullanılmadan kültüre edilen *Blank* grubu glomerüllerinin de kültürlenme işleminden başarılı olarak çıktığı tespit edildi. Silastazol grubundaki glomerüller belirgin bir bozulma göstermedi. Glikoz ve Klorokin grubu glomerüllerde lezyonlar oluştuğu, kapillerlerde kapanma ve dejenerasyon bulunduğu görüldü. Glikoz + Klorokin (GK) grubundaki glomerüllerde daha fazla lezyon tespit edildi. Silastazolün hasar oluşturan etken maddelerle birlikte kullanıldığı Silastazol + Glikoz (SG), Silastazol + Klorokin (SK) ve Silastazol + Glikoz + Klorokin (SGK) gruplarındaki glomerüllerde lezyon

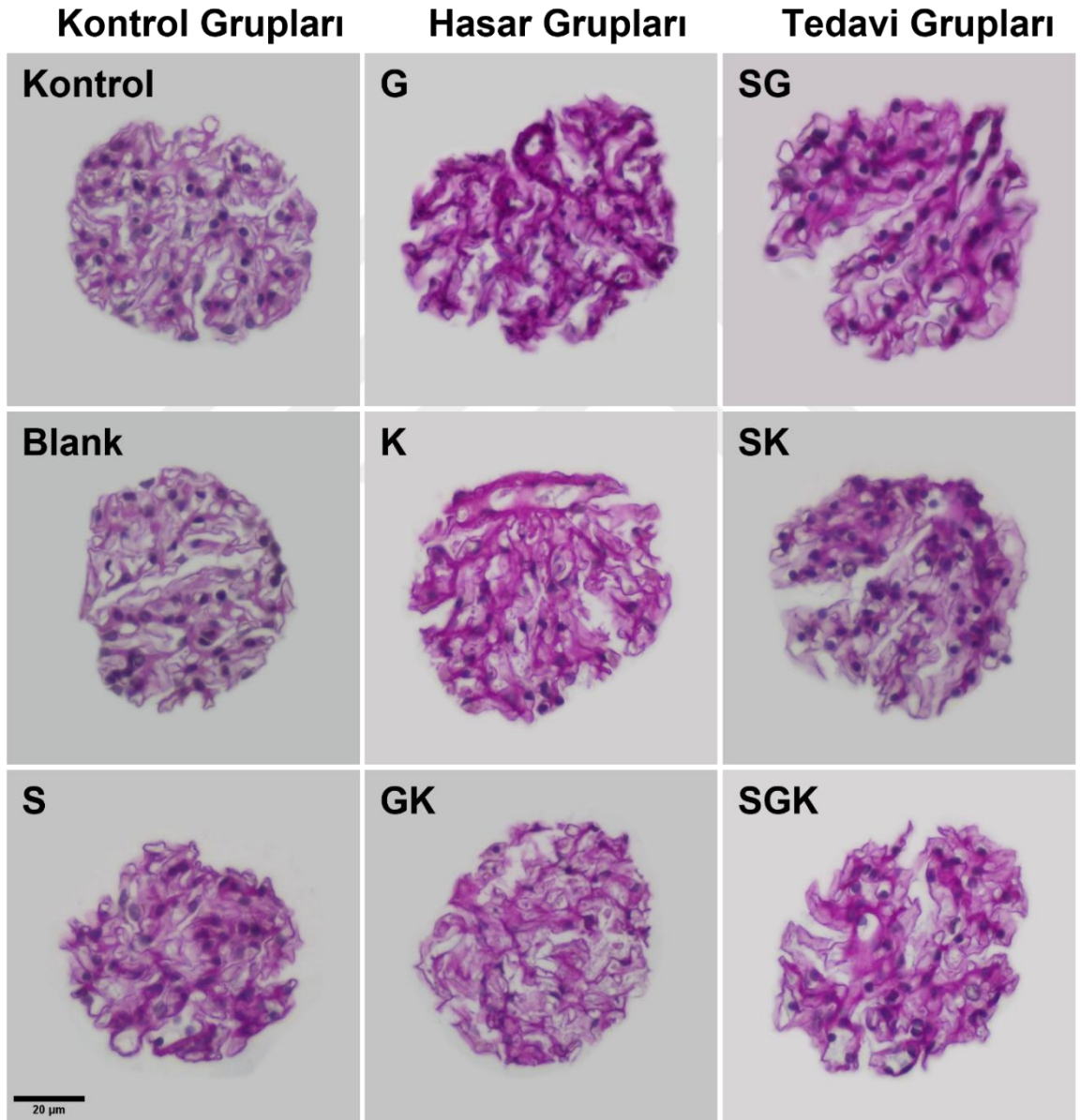
bulgularının hafiflediği, kapillerlerin yapısının daha açık olduğu ve glomerüllerin bütünlüklerini daha fazla koruduğu tespit edildi.



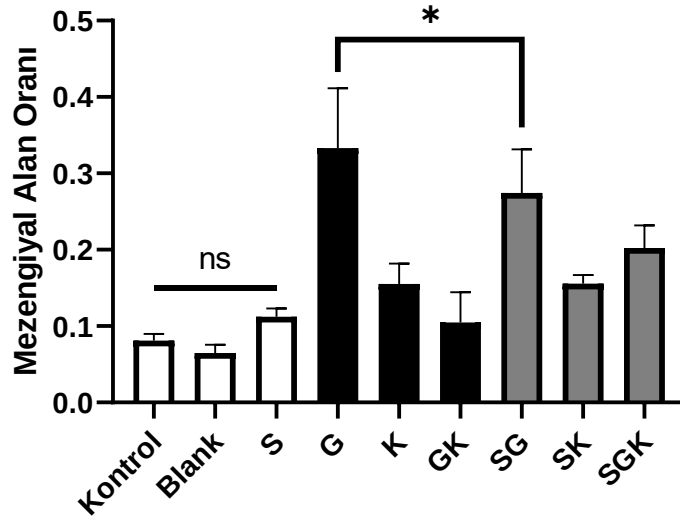
Şekil 4-2: Hematoksilen & Eozin boyaması ile yapılan histomorfolojik değerlendirmeye ait mikrogramlar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)

4.2.2. Periyodik Asit Schiff & Hematoksilen Kombine Boyama Bulguları

Glomerüller üzerinde mezengiyal alan değerlendirmesi yapabilmek için Periyodik Asit Schiff & Hematoksilen kombine boyaması gerçekleştirildi (Şekil 4-3). Boyanan glomerüllerin mezengiyal alan miktarları bakımından karşılaştırılmasında kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken diğer GK hariç tüm gruplar *Blank* grubuna göre anlamlı artış göstermiş olarak bulundu (Şekil 4-4). Mezengiyal alan genişlemesinin en fazla Glikoz grubunda olduğu, SG grubunda ise Glikoz grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi.



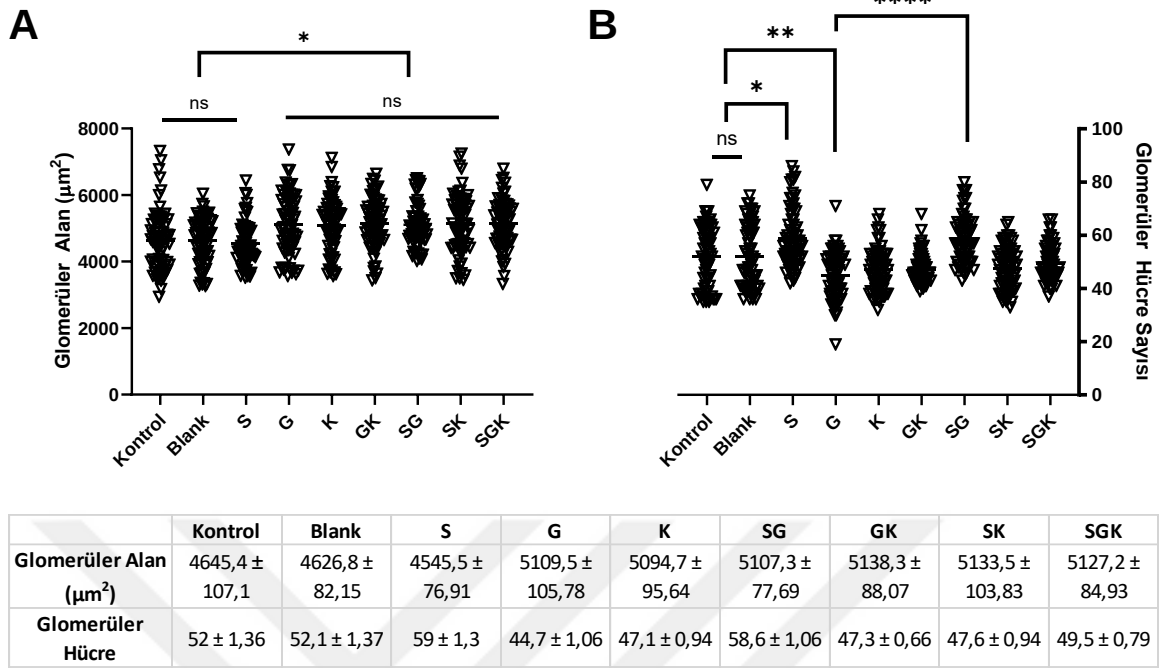
Şekil 4-3: Periyodik Asit Schiff & Hematoksilen kombine boyaması ile yapılan mezengiyal alan değerlendirmesine ait mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)



Şekil 4-4: Glomerüler mezengiyal alan oranlarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafik. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; ns: anlamlı fark yok, * $p < 0,05$.)

4.3. Glomerüler Alan ve Glomerüler Hücre Miktarı Değerlendirmesi

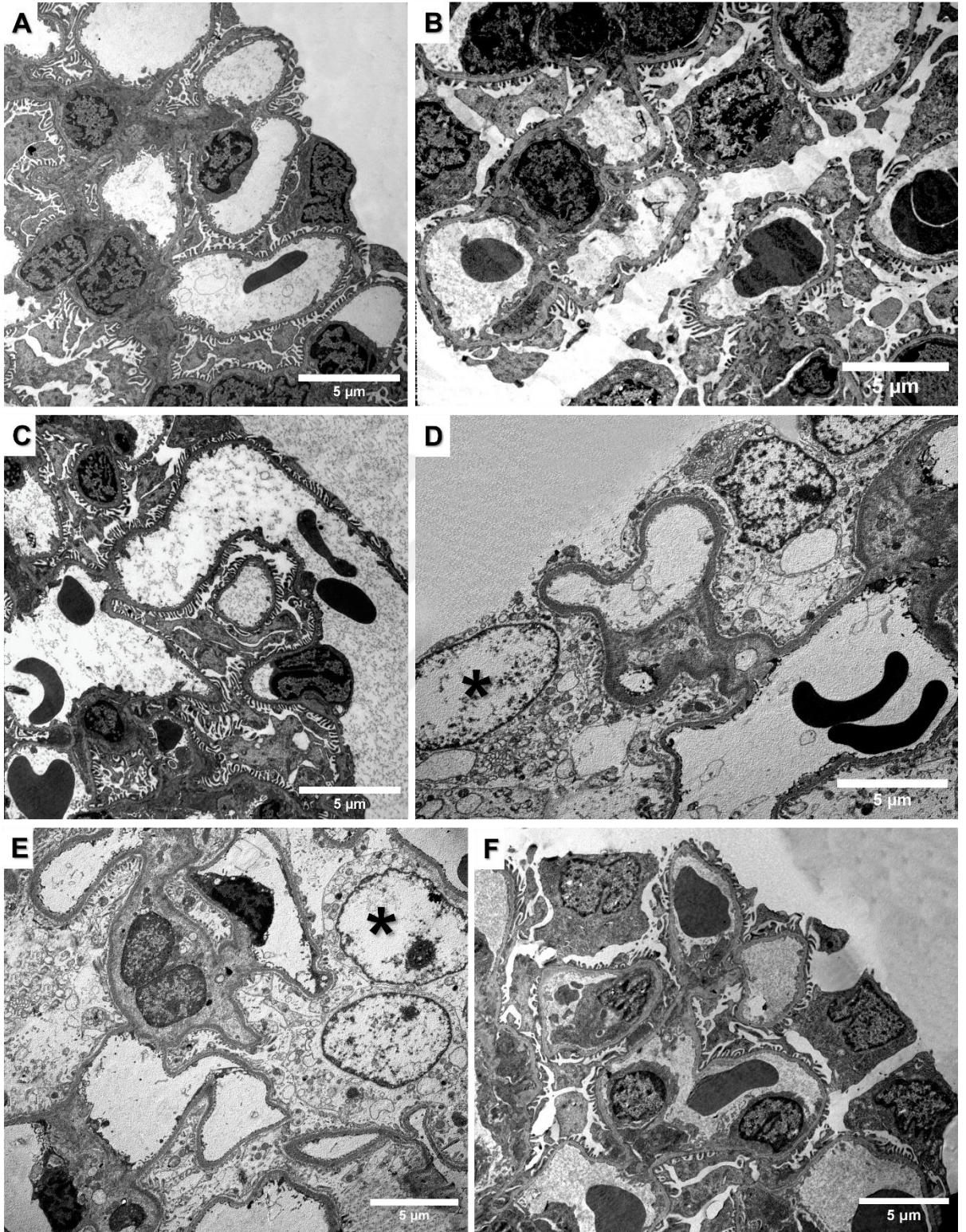
Glomerüllerdeki alan ve hücre miktarı değişimini incelemek için glomerüler alan ölçümü ve glomerüler hücre sayımı yapıldı. Glomerüler alan ölçümlerinde kontrol grupları arasında anlamlı farklılık bulunmazken hasar ve tedavi gruplarının tümünün kontrol gruplarına göre anlamlı oranda artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 4-5A). Glomerüler hücre sayımında Kontrol ve *Blank* grubu arasında anlamlı fark bulunmadı. Silastazol grubunun ise Kontrol ve *Blank* gruplarına göre anlamlı olarak daha fazla hücre içerdiği görüldü. Glikoz grubundaki hücre sayısının önemli derecede azaldığı, SG grubunun ise Glikoz grubuna göre önemli oranda daha fazla hücre içerdiği tespit edildi. Klorokin, GK, SK ve SGK gruplarının birbirlerine yakın seviyelerde hücre içerdiği görüldü (Şekil 4-5B).



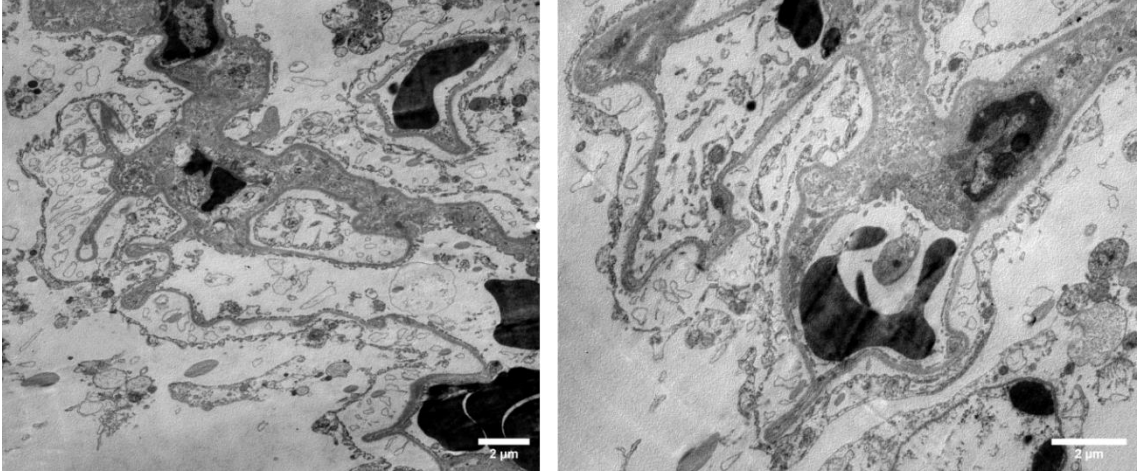
Şekil 4-5: Glomerüler alan büyüklüklerini (A) ve glomerüler hücre sayılarını (B) gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafikler. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; ns: anlamlı fark yok, *p<0,05, **p<0,005, **p<0,0001.)**

4.4. Ultrastrüktürel Bulgular

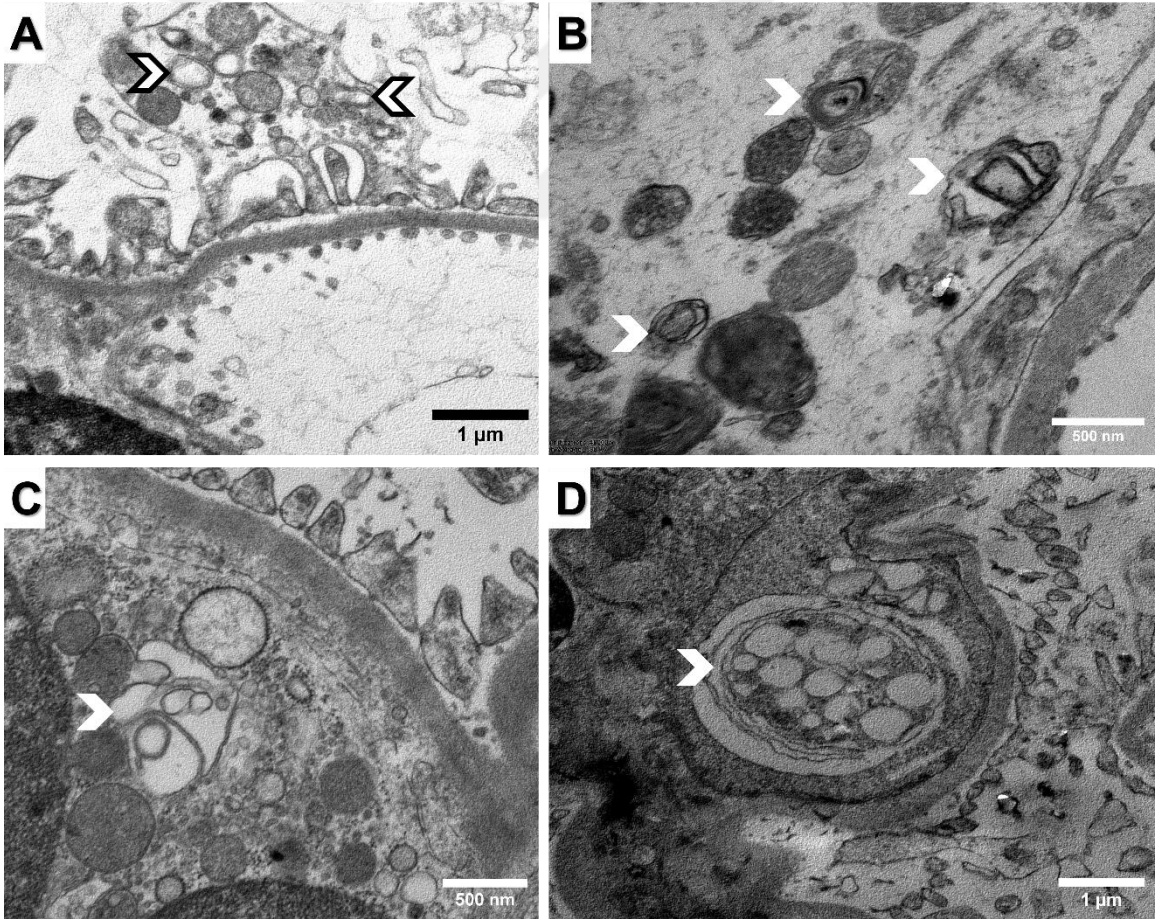
Glomerüller ultrastrüktürel olarak incelendiğinde Kontrol, Blank ve Silastazol grubu glomerüllerinin genel ultrastrüktürel formunu koruduğu görüldü. Glikoz, Klorokin ve GK grubu glomerüllerde ise yaygın dejenerasyon, pedisel dökülmesi, karyolitik podosit hücreleri ve genel ultrastrüktürel fakirleşme olduğu tespit edildi (Şekil 4-6). SG grubunda ise bu dejenerasyonlar daha az olarak izlendi. GK grubunda yaygın glomerül dejenerasyonu ile beraber kolloba olmuş kapillerler ve glomerüler bazal membrandan koparak ayrılmış pedisel zincirleri görüldü (Şekil 4-7). Klorokin uygulanan gruplarda otofagozom varlığı gösterildi ve bu otofagozomların hasar görmüş mitokondrilerin yakınında olduğu görüldü (Şekil 4-8). En fazla GK grubunda olmak üzere podositlerde çok sayıda, üzeri ribozomlarla kaplı genişlemiş veziküller bulunduğu ve bu veziküllerin hasar görmüş mitokondrilere yakın komşulukta olduğu tespit edildi (Şekil 4-9). Bu formdaki yapıların mezengiyal hücre çekirdekleriyle ilişkili olarak da ortaya çıktığı görüldü (Şekil 4-10).



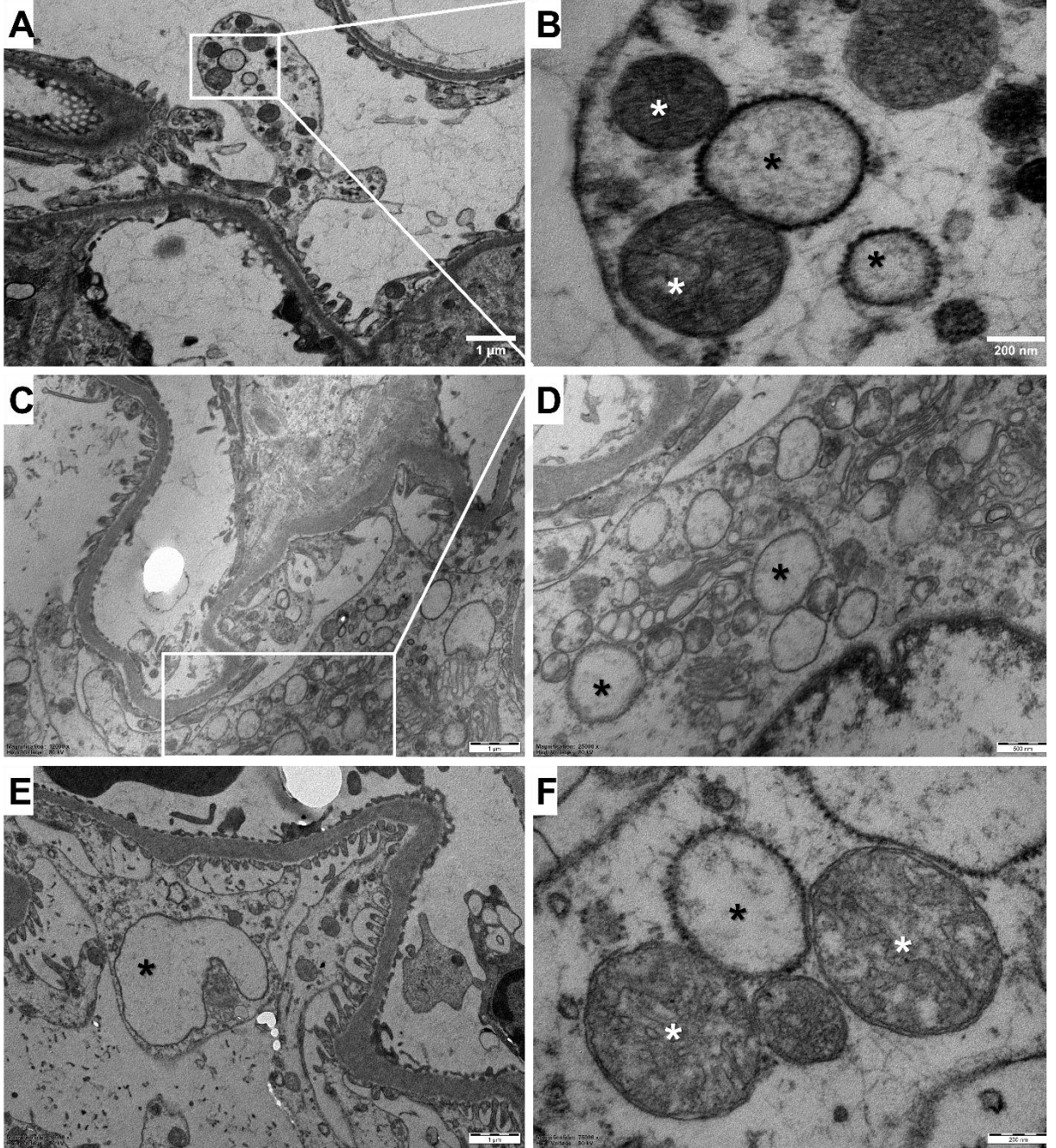
Şekil 4-6: Farklı gruplara ait glomerüllerin genel durumunu gösteren elektron mikroskopik görüntüler. (A: Kontrol, B: Blank, C: Silastazol, D: Glikoz, E: Glikoz + Klorokin, F: Silastazol + Glikoz; siyah asteriks: karyolitik podosit, bar: 5 µm.)



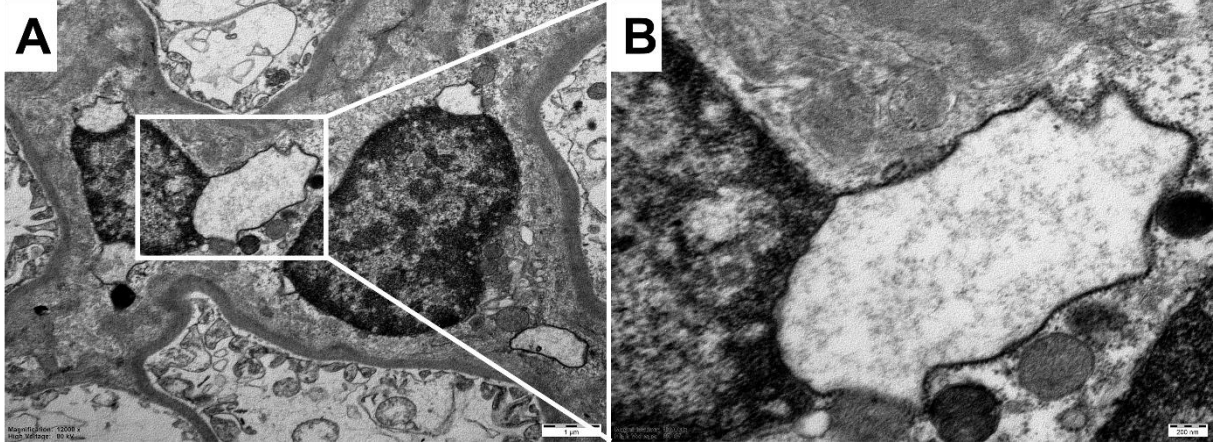
Şekil 4-7: Kollobe olmuş kapillerleri ve glomerüler bazal membrandan koparak ayrılmış pediselleri gösteren görüntüler. (Glikoz + Klorokin grubu, bar: 2 µm)



Şekil 4-8: Otofagozom yapılarını (beyaz ok) gösteren elektron mikroskopik görüntüler. (Glikoz + Klorokin grubu; A - B: Podosit, C - D: Mezengiyal hücre; bar A, D: 1 µm; B, C: 500 nm)

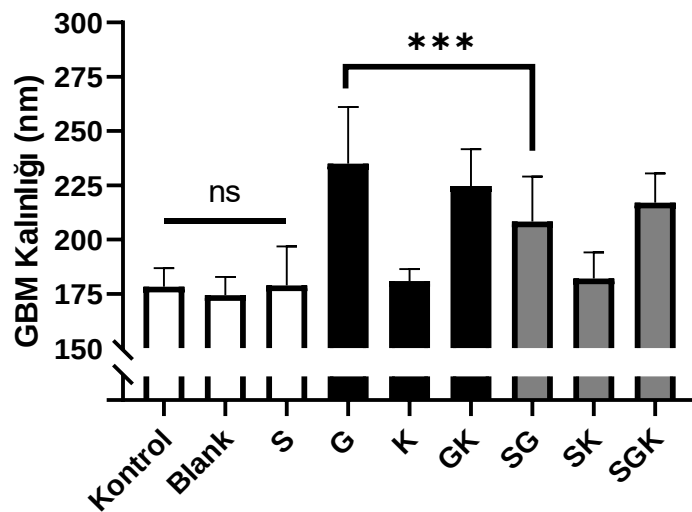


Şekil 4-9: Podositlerde görülen üzeri ribozomlarla çevrili genişlemiş vezikülleri (siyah asteriks) ve yakın komşuluğundaki mitokondrileri (beyaz asteriks) gösteren elektron mikroskopik görüntüler. (Glikoz + Klorokin grubu; bar A, C, E: 1 µm; B, F: 200 nm; D: 500 nm)

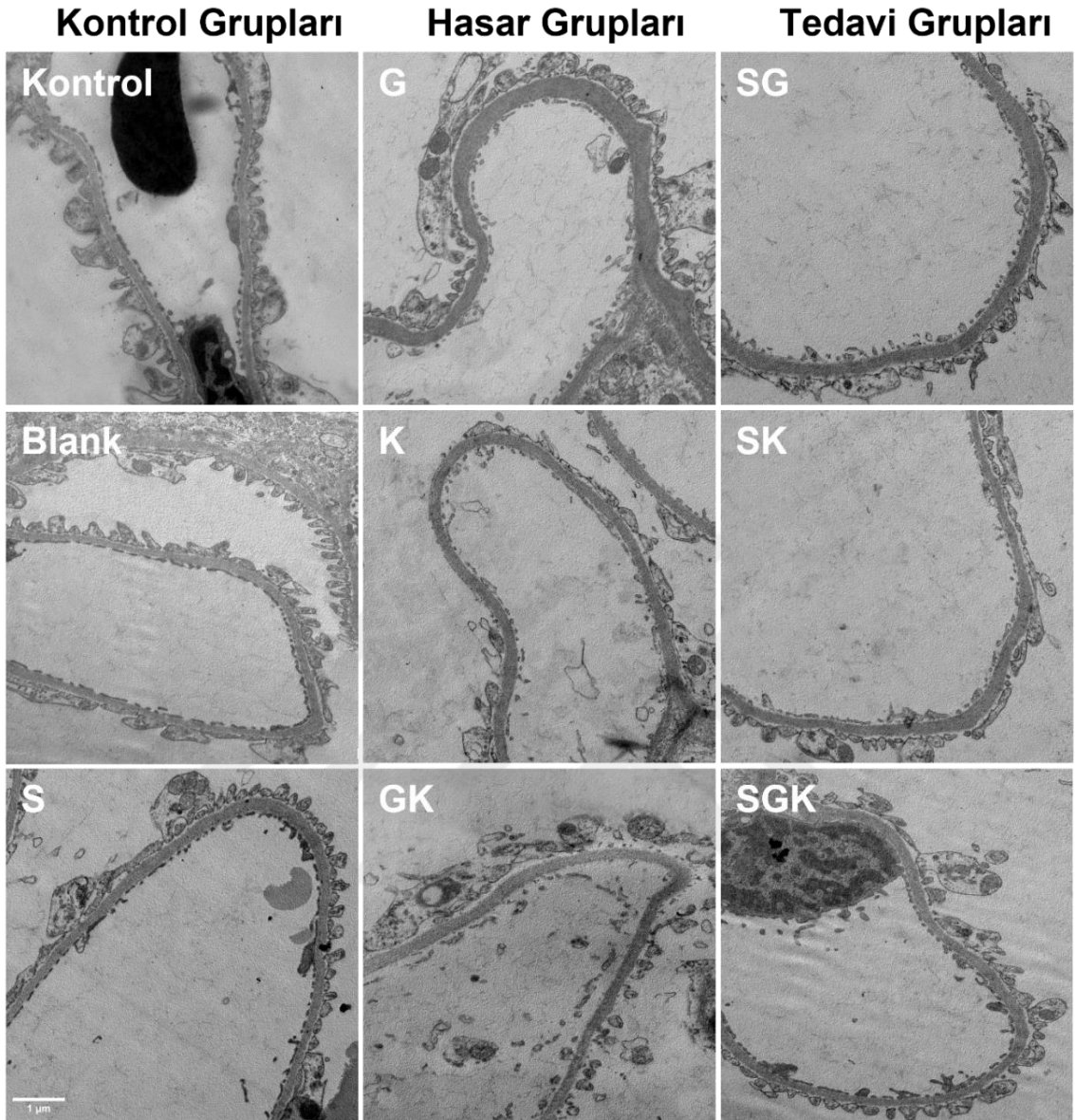


Şekil 4-10: Mezengiyal hücrelerde çekirdek etrafında izlenen üzeri ribozomlarla çevrili genişlemiş veziküler yapı. (Glikoz + Klorokin grubu; bar A: 1 µm; B: 200 nm)

Ultrastrüktürel yapı üzerinde morfometrik analiz yapmak için glomerüler bazal membran (GBM) ölçümleri alındı (Şekil 4-12). Bu ölçümler sonucu Kontrol, *Blank*, Silastazol, Klorokin ve SK grupları arasında GBM kalınlıkları bakımından anlamlı fark tespit edilmedi. Glikoz, GK ve SGK grubundaki glomerüllere ait GBM kalınlıklarının ise Kontrol ve *Blank* grubuna ait glomerüllere göre anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü. SG grubundaki glomerüllerin GBM kalınlığının, kontrol gruplarına göre daha fazla olmasına rağmen Glikoz grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 4-11).



Şekil 4-11: GBM kalınlıklarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafik. (ns: anlamlı fark yok, *p<0,0005)**

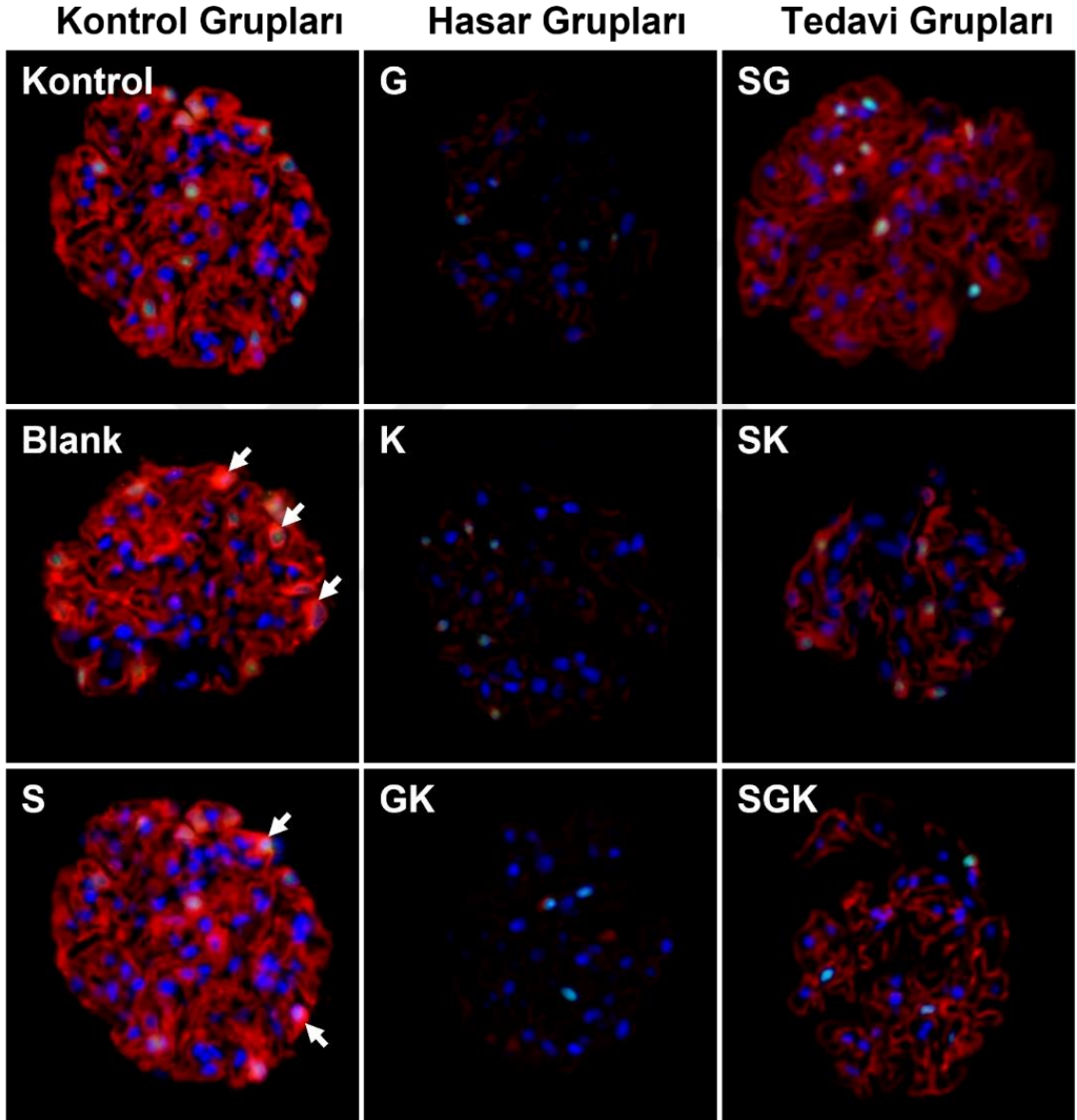


Şekil 4-12: Ultrastrüktürel incelemeyle glomerüler bazal membran üzerinden yapılan morfolometrik analize ait mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; bar: 1 µm.)

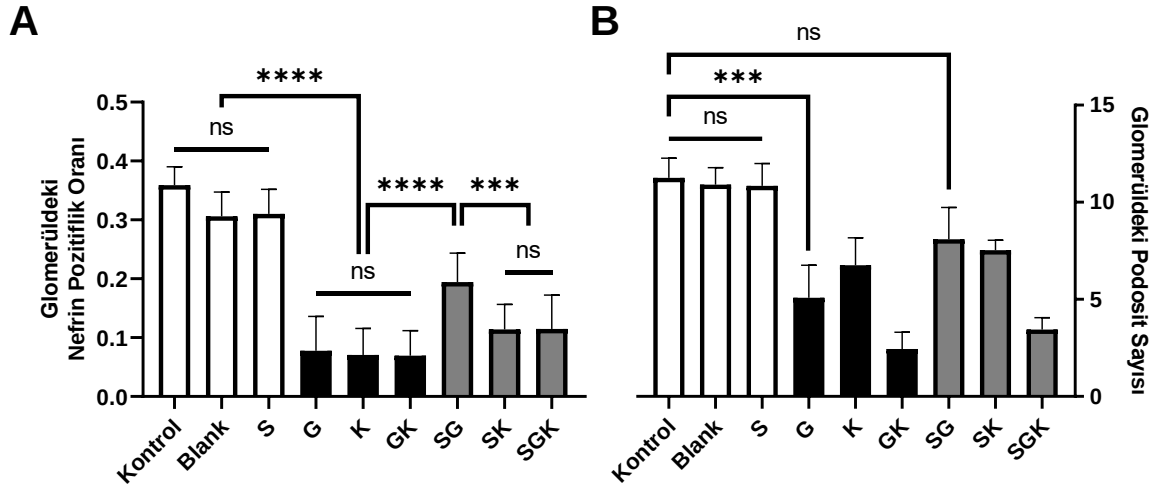
4.5. Glomerül Korunumunun Değerlendirilmesi: Nefrin/WT1

Tüm gruplara ait glomerüller, Nefrin/WT1 ikili immünfloresan işaretlemesi yapılarak nefrin ve podosit miktarı bakımından kantitatif olarak değerlendirildi (Şekil 4-13, Şekil 4-15, Şekil 4-16). Kontrol grubundaki glomerüllerle karşılaştırılan *Blank* ve Silastazol grubu glomerüllerinin nefrin ve podosit miktarı bakımından anlamlı fark göstermediği tespit edildi (Şekil 4-14).

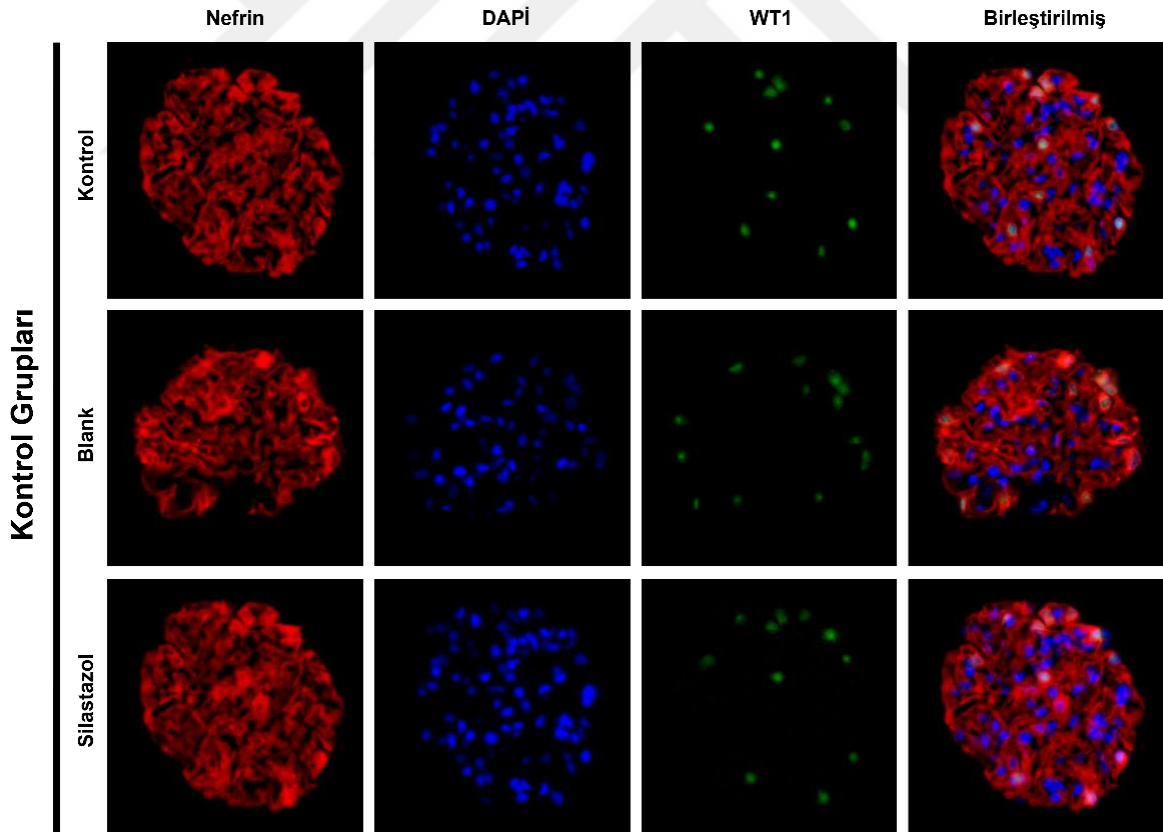
Bununla birlikte *Blank* ve Silastazol grubuna ait glomerüllerde podosit hücre gövdesinde toplanan nefrin ekspresyonu olduğu görüldü. Glikoz, Klorokin, GK, SK ve SGK gruplarında nefrin ve podosit miktarının anlamlı oranda azaldığı tespit edildi. SG grubundaki nefrin ve podosit miktarlarının ise kontrol gruplarına göre azalma göstermiş olmakla birlikte hasar gruplarına göre anlamlı oranda daha fazla olduğu belirlendi.



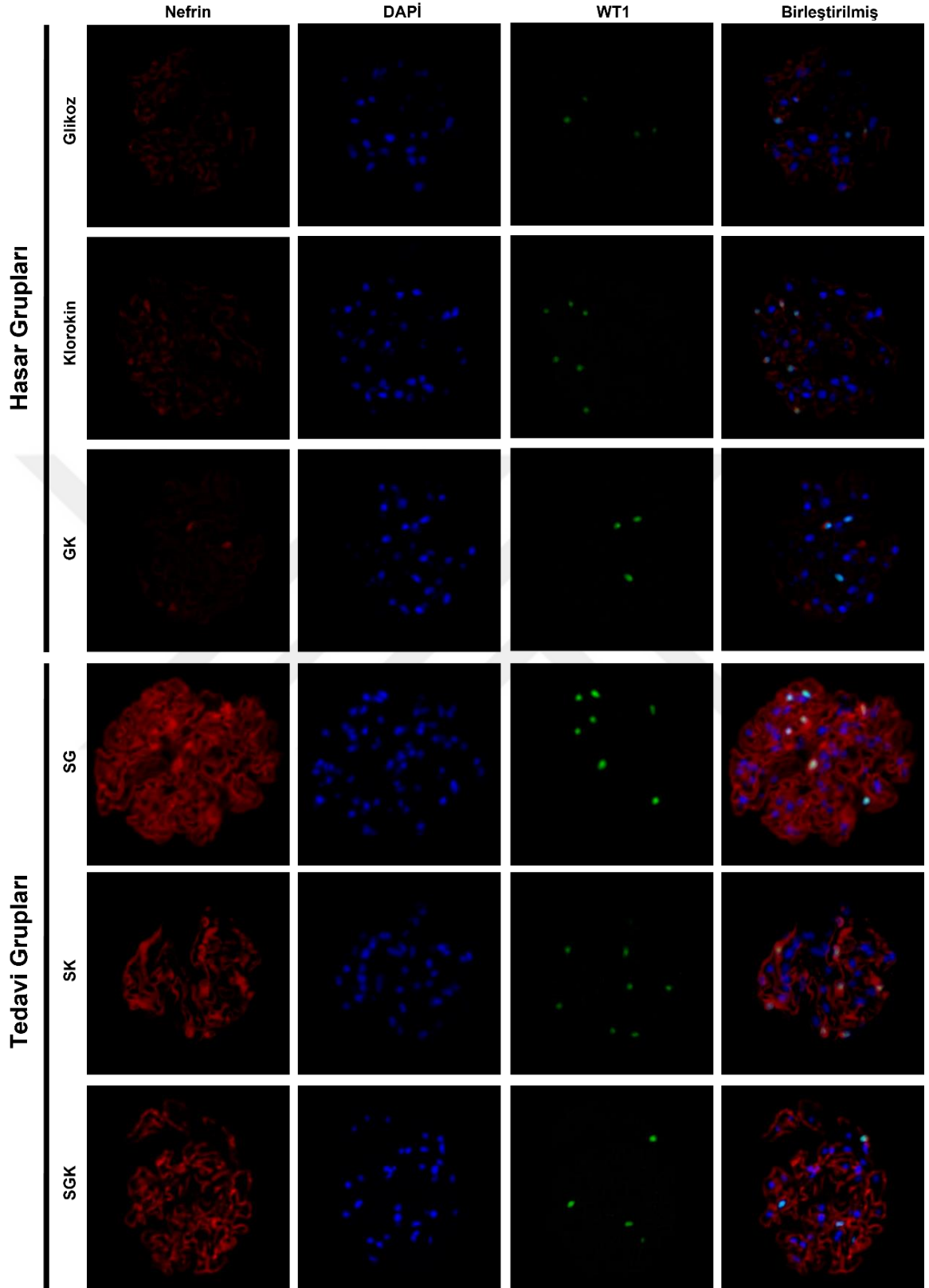
Şekil 4-13: Glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (beyaz ok: podosit hücre gövdesindeki nefrin birikimleri; S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; çekirdek işaretlemesi için DAPI kullanılmıştır, X40 büyütme.)



Şekil 4-14: Glomerüllerdeki nefrin pozitiflik oranlarını (A) ve podosit sayılarını (B) gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafikler. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; ns: anlamlı fark yok, *p<0,0005, ****p<0,0001.)**



Şekil 4-15: Kontrol gruplarına ait glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini ayrı ayrı gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)

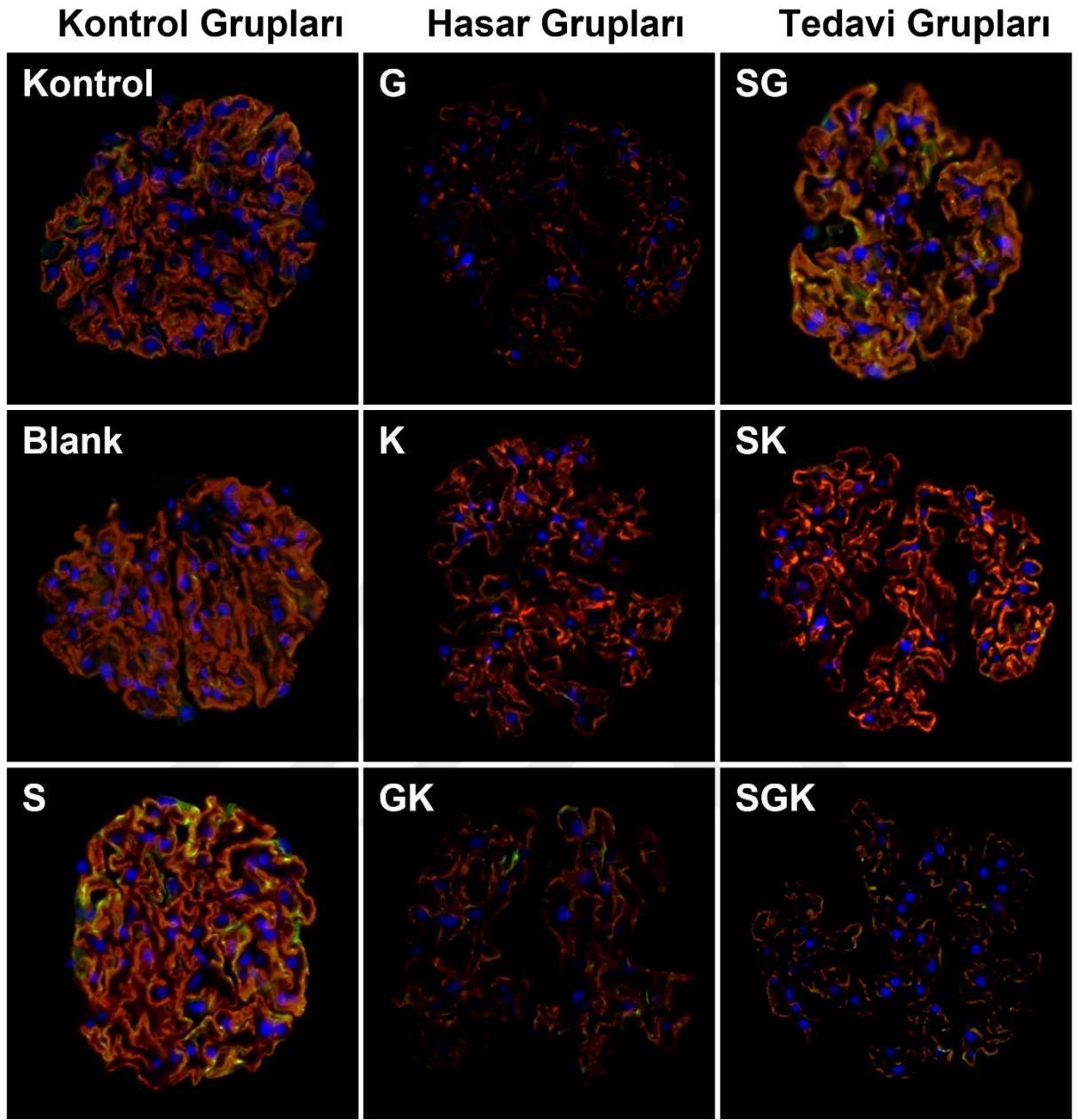


Şekil 4-16: Hasar ve tedavi gruplarına ait glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini ayrı ayrı gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)

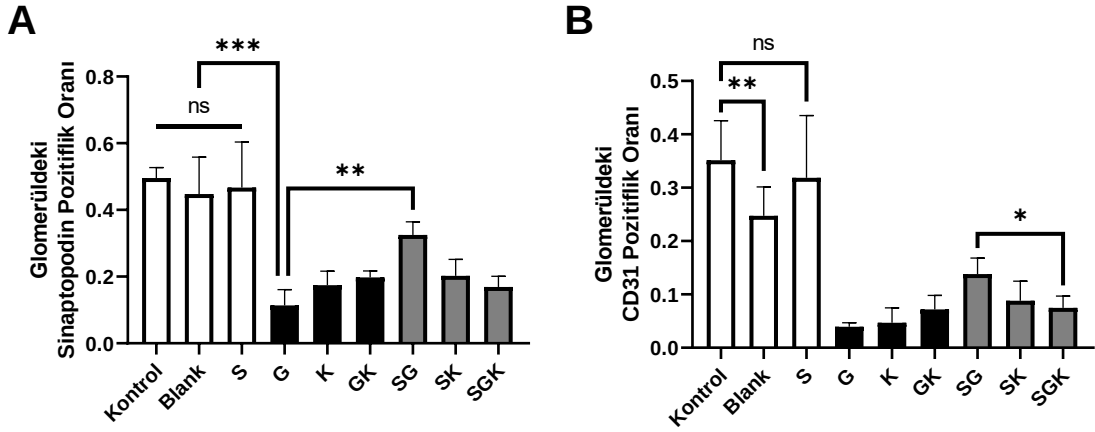
4.6. Endotel ve Podosit Hücrelerinin Dağılımının Değerlendirilmesi: Synpo/CD31

Glomerül korunumu incelendikten sonra glomerüllerin içerisindeki endotel ve podosit hücrelerinin dağılımını ve durumunu değerlendirmek için sinaptopodin/CD31 ikili immünfloresan boyaması yapıldı (Şekil 4-17, Şekil 4-19, Şekil 4-20). Sinaptopodin’le yapılan podosit gösteriminde kontrol grupları arasında anlamlı farklılık bulunmazken Glikoz, Klorokin, SK ve SGK gruplarında sinaptopodin miktarının önemli oranda azaldığı görüldü (Şekil 4-18, A). SG grubunda ise Glikoz grubuna göre anlamlı oranda daha fazla sinaptopodin ekspresyonu görüldü.

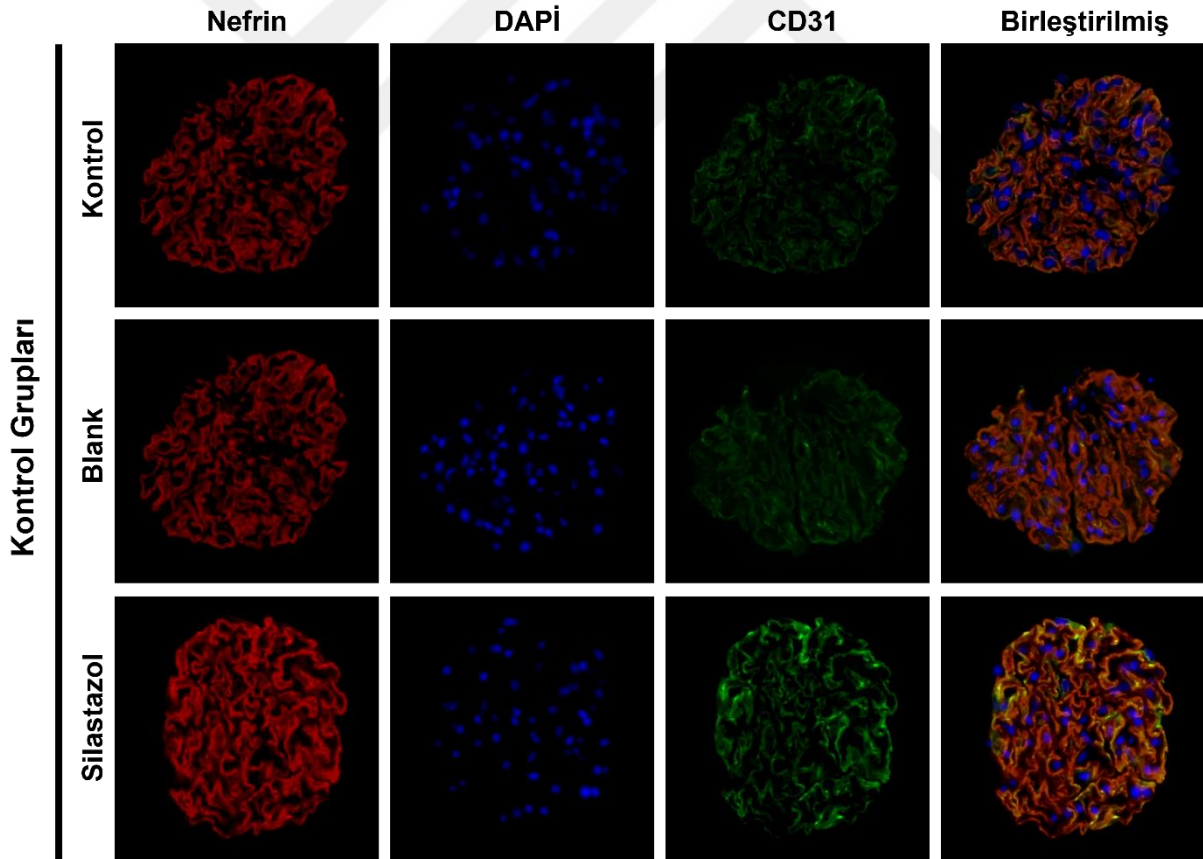
CD31 ekspresyon seviyeleri gruplar arası karşılaştırıldığında ise *Blank* grubunun Kontrol grubuna göre daha az CD31 pozitifliği gösterdiği tespit edildi (Şekil 4-18, B). Silastazol grubunda ise bu anlamlı miktardaki azalma görülmedi. Glikoz grubundaki CD31 pozitifliğinin yok denecek miktarlara gerilediği, SG grubunda ise Glikoz grubuna göre daha fazla olduğu tespit edildi. SG grubuyla SGK grubu karşılaştırıldığında Klorokin eklenmesinin glomerüllerdeki CD31 ekspresyonunu azalttığı görüldü.



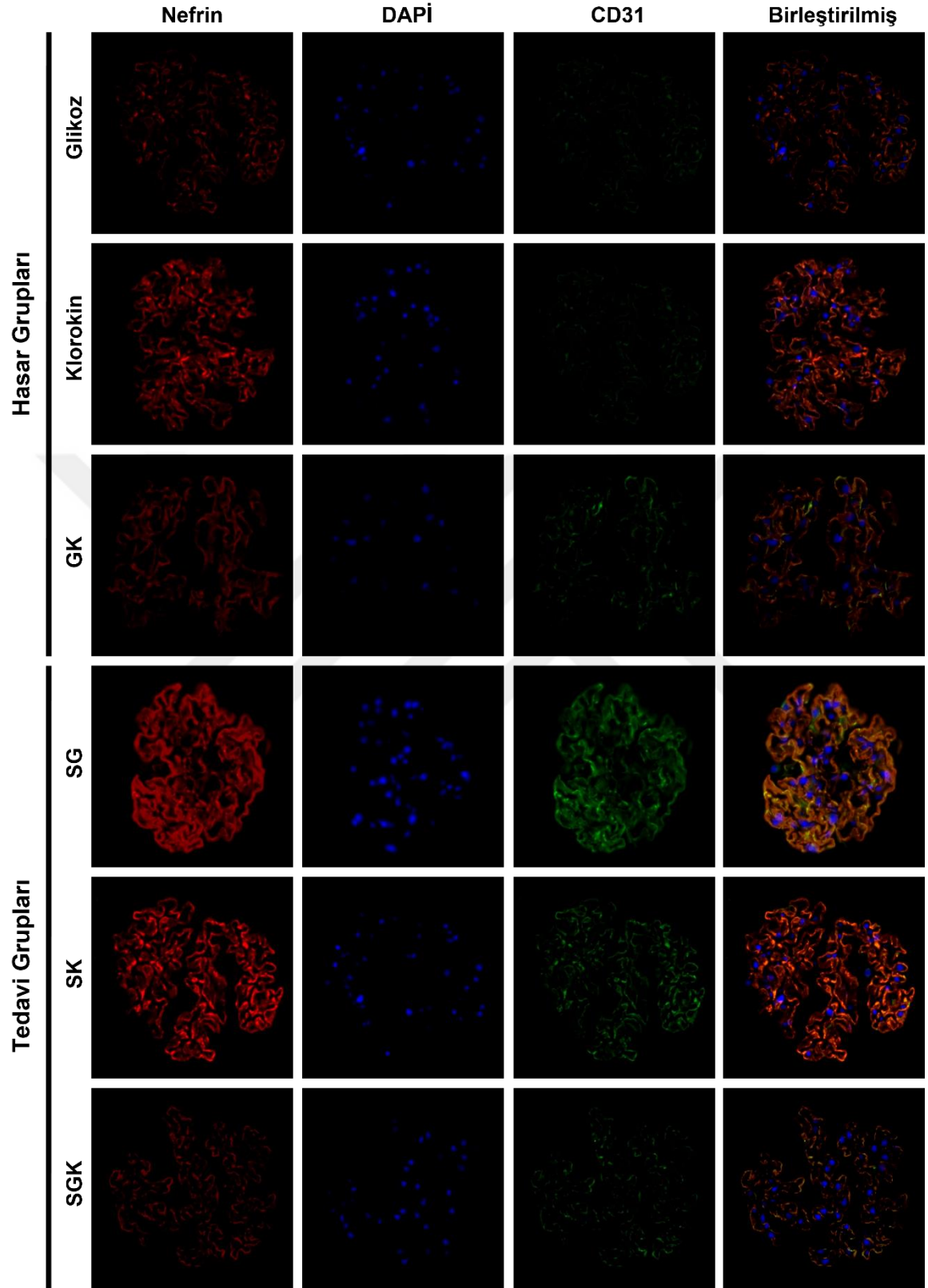
Şekil 4-17: Glomerüllerin sinaptopodin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; çekirdek işaretlemesi için DAPI kullanılmıştır, X40 büyütme.)



Şekil 4-18: Glomerüllerdeki sinaptopodin (A) ve CD31 (B) pozitiflik oranlarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafikler. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; ns: anlamlı fark yok, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, * $p < 0,0005$.)**



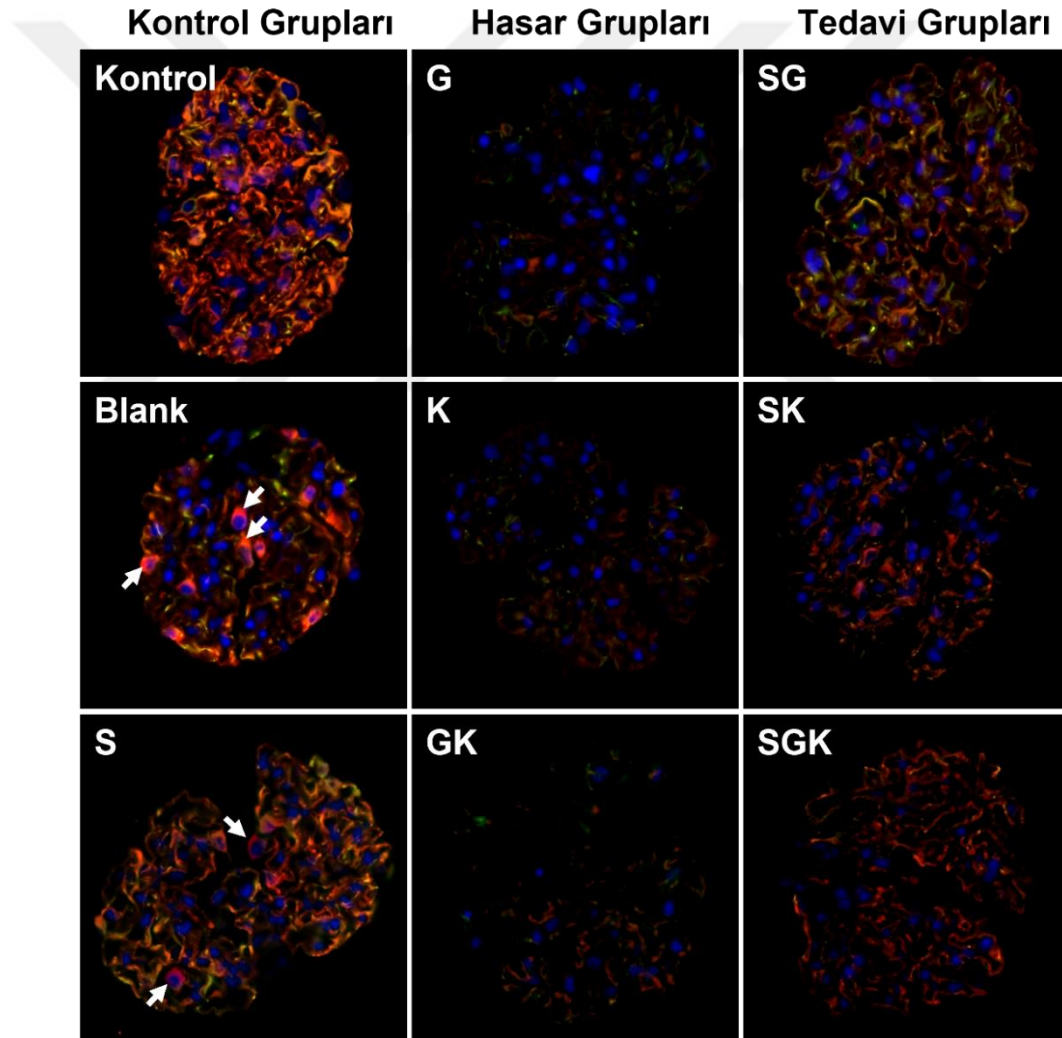
Şekil 4-19: Kontrol gruplarına ait glomerüllerin sinaptopodin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini ayrı ayrı gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)



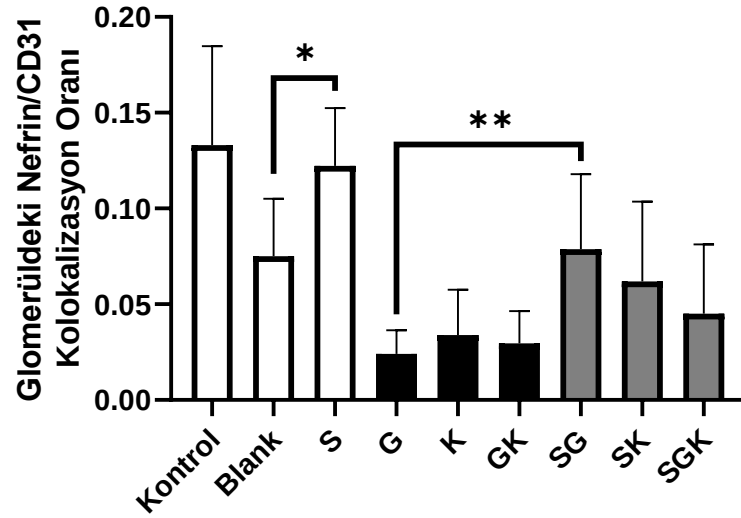
Şekil 4-20: Hasar ve tedavi gruplarına ait glomerüllerin sinaptopodin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini ayrı ayrı gösteren mikroyraflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)

4.7. Fonksiyonel Birim Değerlendirmesi: Nefrin/CD31

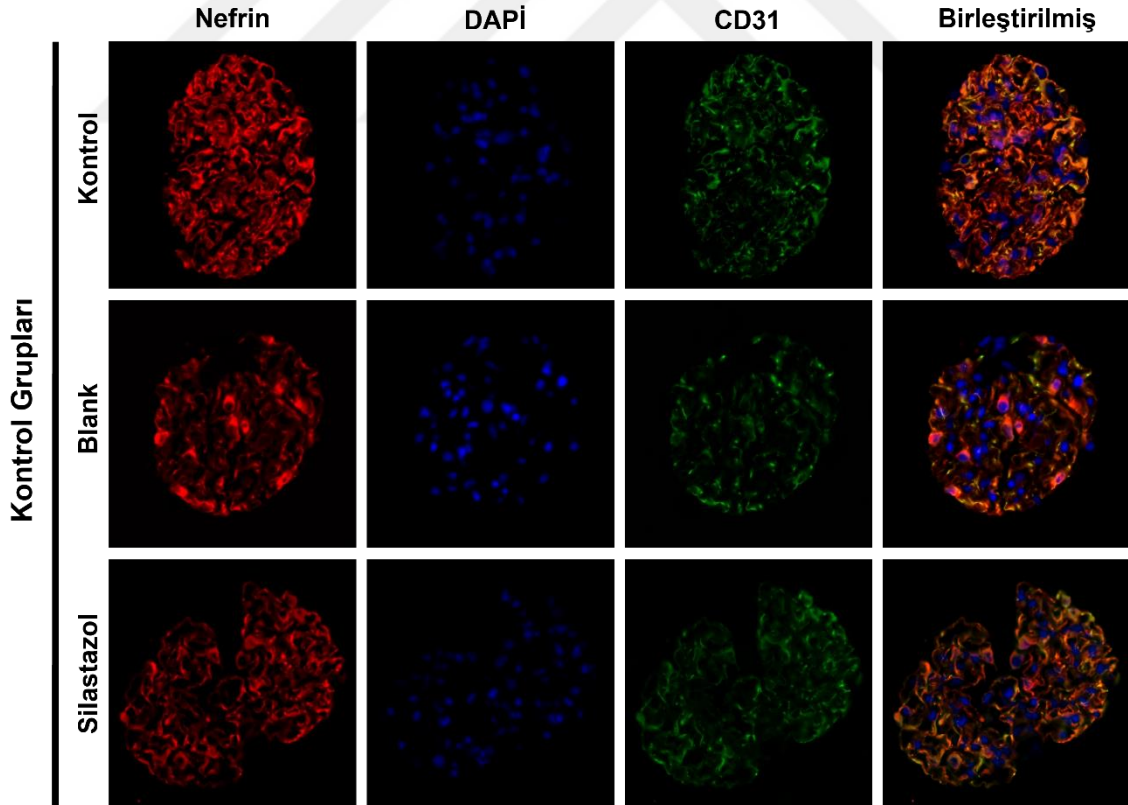
Glomerül üzerinde yapılan Nefrin/CD31 ikili immünfloresan boyamasıyla podosit ve endotel hücrelerinin birlikte korunduğu bölgelerin değerlendirilmesi yapıldı (Şekil 4-21, Şekil 4-23, Şekil 4-24). Glomerüler Filtrasyon Bariyerinin (GFB) karşılıklı iki elemanı olan podosit ve endotel hücreleri sırasıyla nefrin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) eksprese ettiğinden dolayı birlikte korunma gösteren GFB bölgeleri bu immünfloresan boyamada sarı renkli olarak tespit edildi. Kontrol, *Blank* ve Silastazol gruplarındaki glomerüllerin korunan GFB bölgeleri bakımından yakın seviyelerde olduğu görüldü (Şekil 4-22). Glikoz grubunda korunan GFB bölgeleri yok denecek kadar azalırken SG grubunda anlamlı oranda daha fazla bulundu.



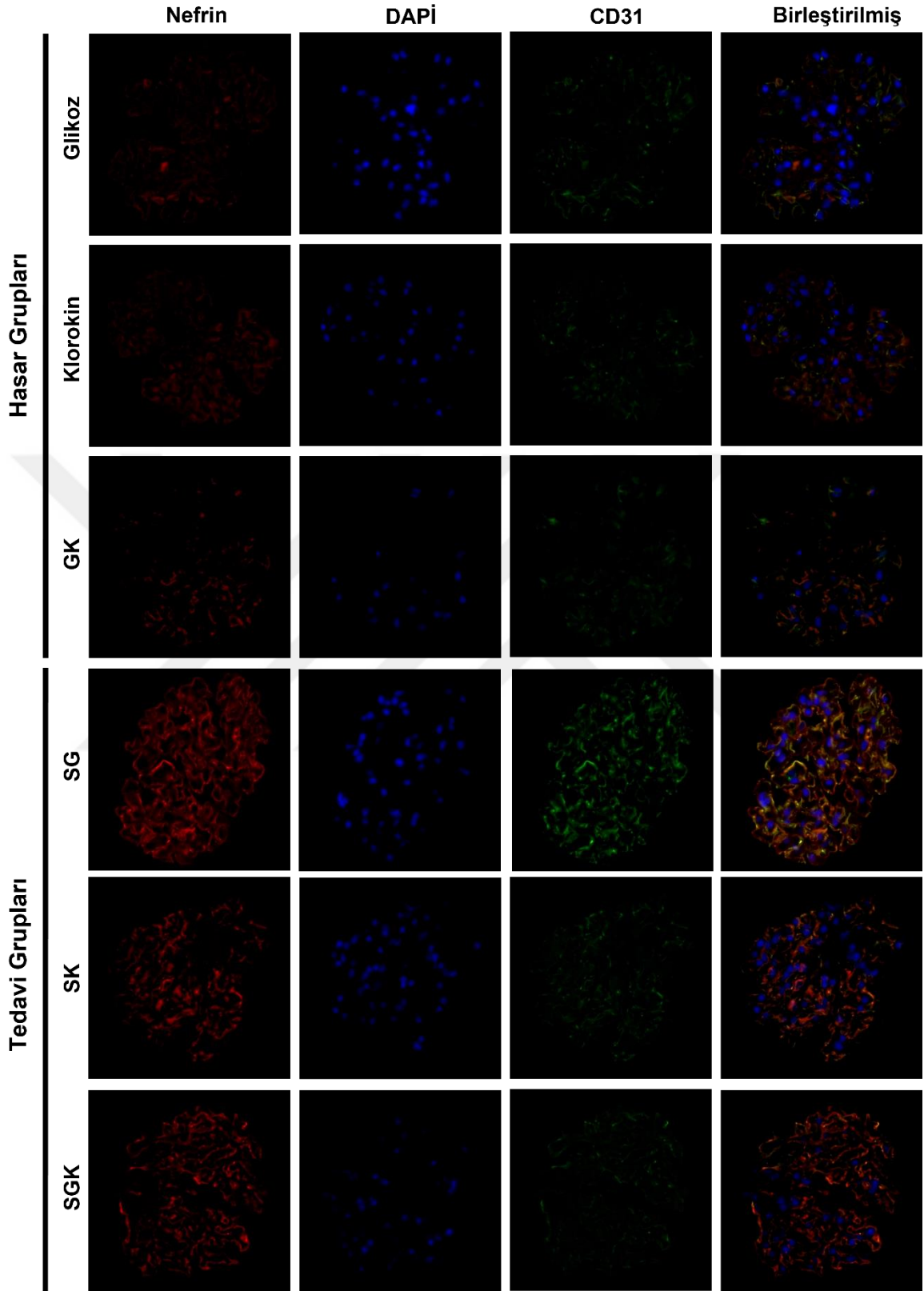
Şekil 4-21: Glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; çekirdek işaretlemesi için DAPİ kullanılmıştır, X40 büyütme.)



Şekil 4-22: Glomerüllerdeki nefrin/CD31 kolokalizasyon oranları gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafik. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; *p<0,05, **p<0,005.)



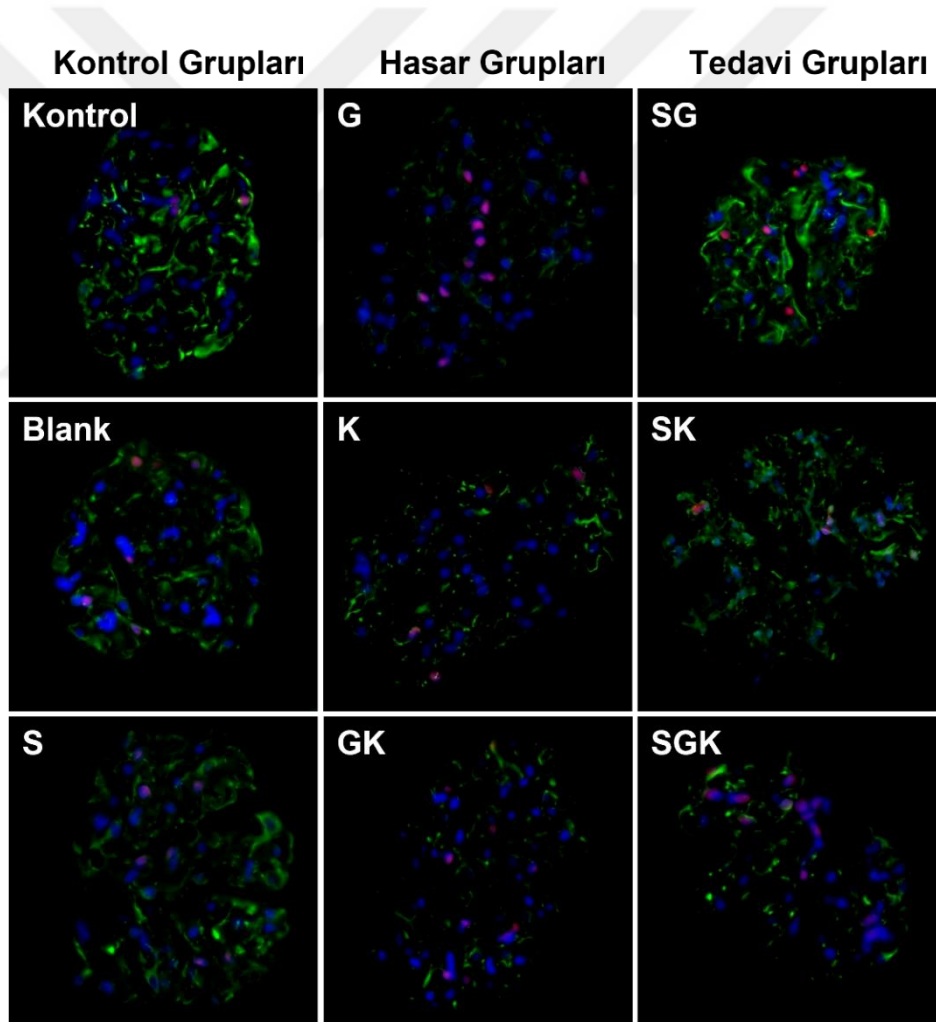
Şekil 4-23: Kontrol grubuna ait glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)



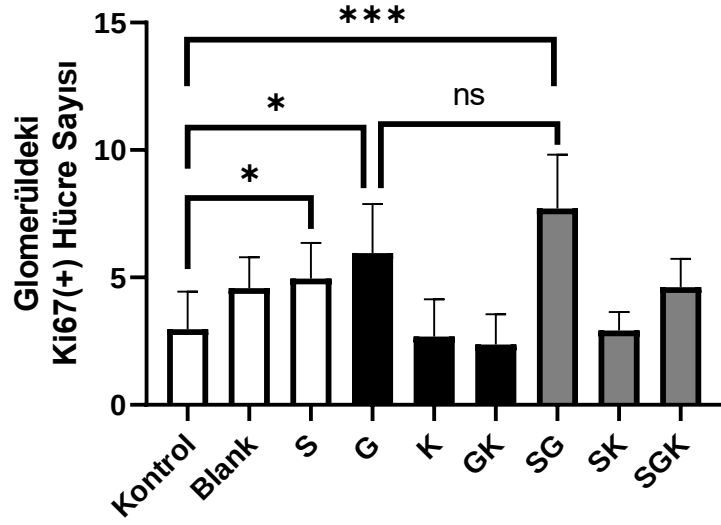
Şekil 4-24: Hasar ve tedavi grubuna ait glomerüllerin nefrin (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)

4.8. Glomerüllerin Proliferatif Hücreler Açısından Değerlendirilmesi: Ki67/CD31

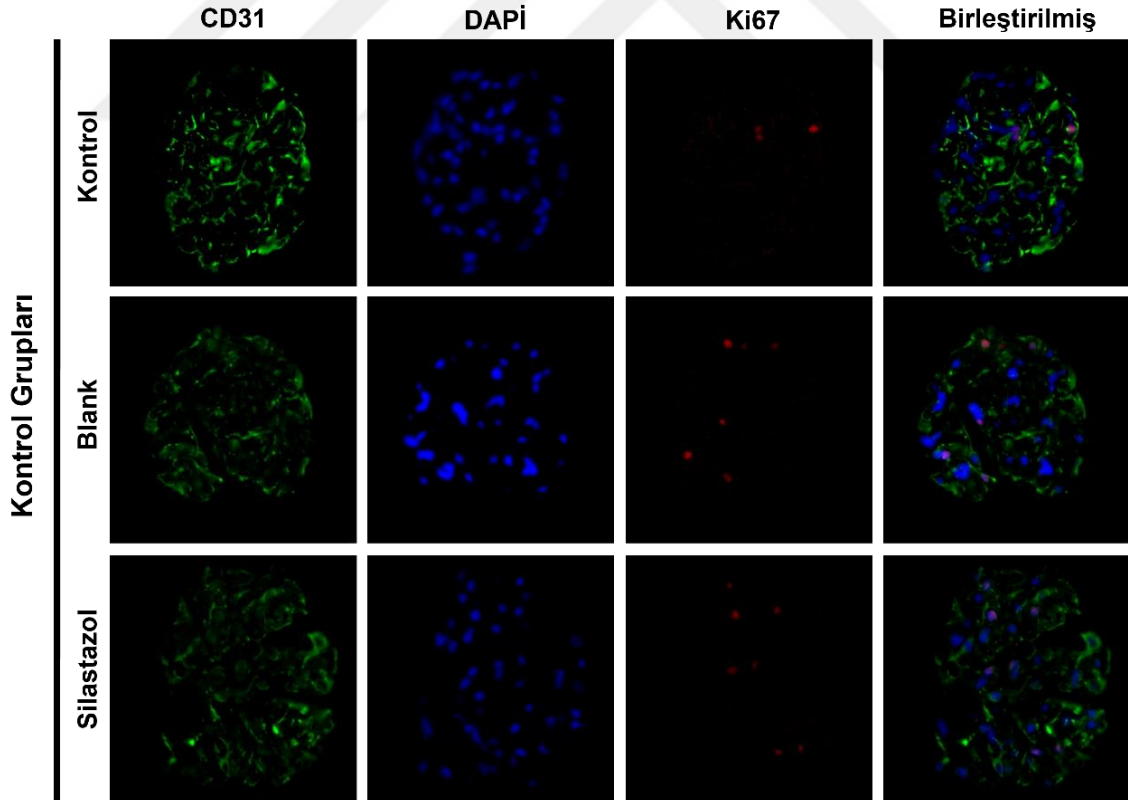
Glomerüldeki mezengiyal hücreler ve endotel hücreleri çoğalma gösterirken podosit hücreleri çoğalma göstermez. Glomerüllere Ki67/CD31 immünfloresan boyaması yapılarak hem glomerül genelinde proliferatif karaktere sahip hücre miktarı tespit edildi hem de bölgesel olarak CD31 ekspresyonuyla yakınlık gösteren proliferatif karakterdeki hücrelerin tespiti sağlandı (Şekil 4-25, Şekil 4-27, Şekil 4-28). Glomerüldeki Ki67 (+) hücre sayısına bakıldığında *Blank* ve Silastazol gruplarında Kontrol grubuna göre daha fazla Ki67 (+) hücre bulunduğu, Silastazol grubundaki fazlalığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Şekil 4-26). Sadece glikoz uygulanan glomerüllerde bulunan Ki67 (+) hücre sayısında da anlamlı artış görülürken en fazla artış SG grubunda tespit edildi.



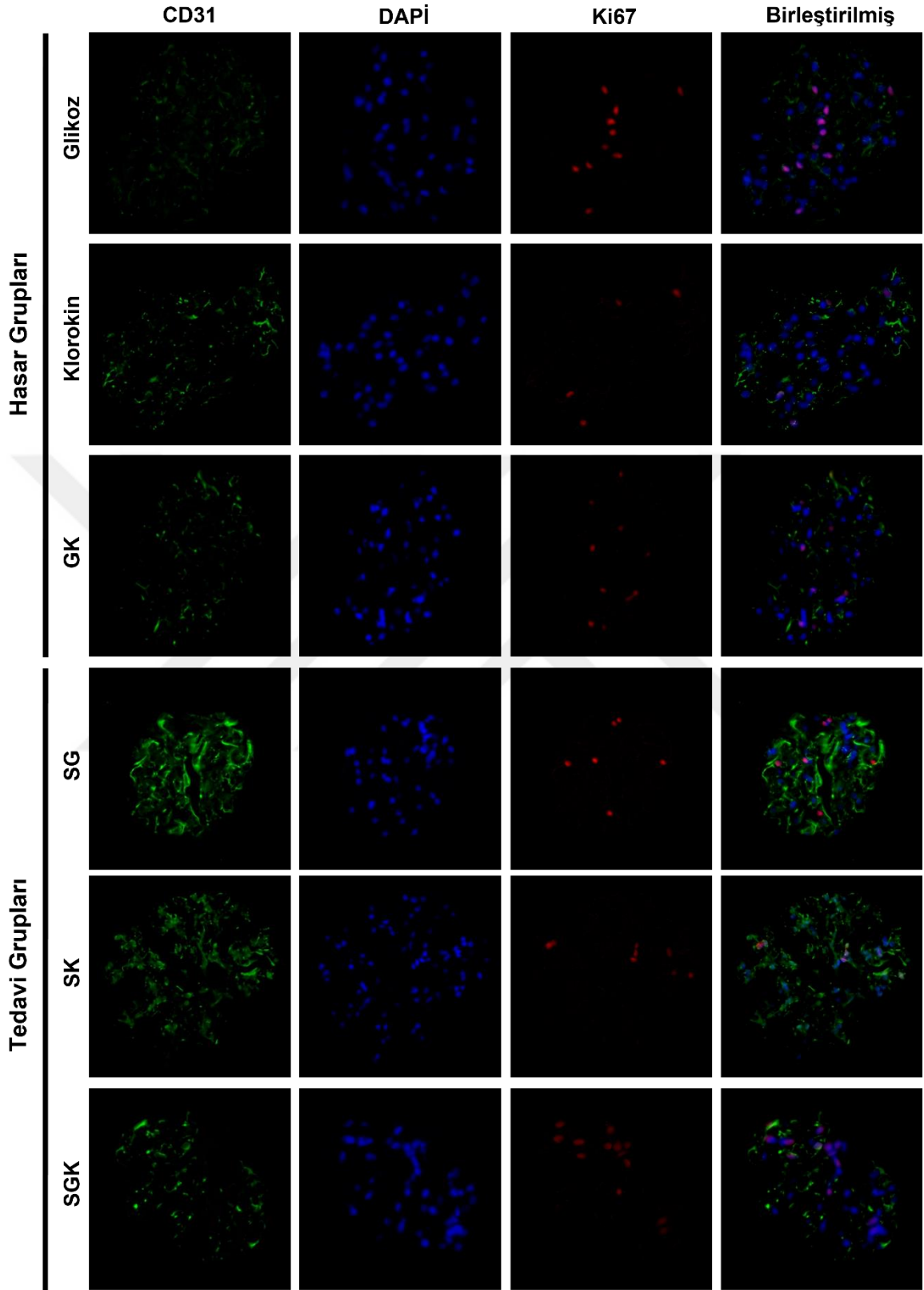
Şekil 4-25: Glomerüllerin Ki67 (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikroyraflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; çekirdek işaretlemesi için DAPI kullanılmıştır, X40 büyütme.)



Şekil 4-26: Glomerüllerdeki Ki67 pozitif hücre sayılarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafik. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; ns: anlamlı fark yok, *p<0,0005.)**



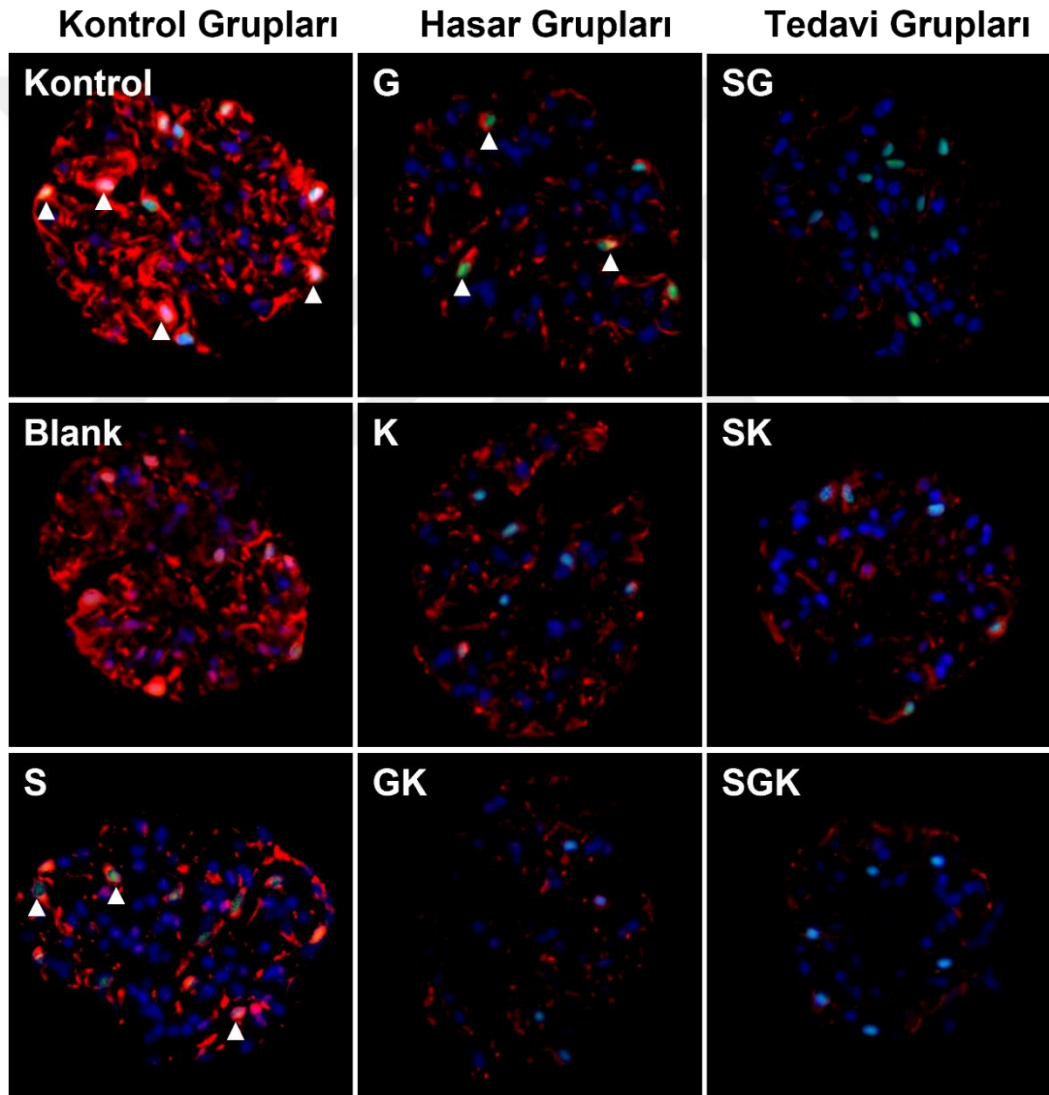
Şekil 4-27: Kontrol gruplarına ait glomerüllerin Ki67 (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)



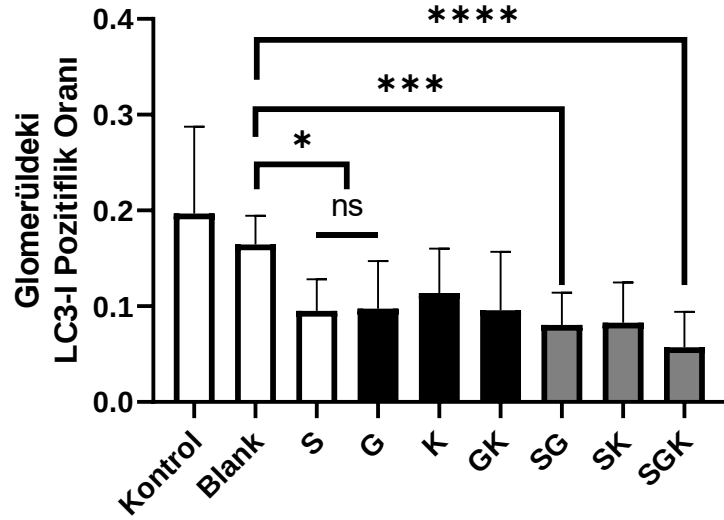
Şekil 4-28: Hasar ve tedavi gruplarına ait glomerüllerin Ki67 (kırmızı) ve CD31 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)

4.9. Otofajik Yanıt Değerlendirmesi: LC3-I/WT1

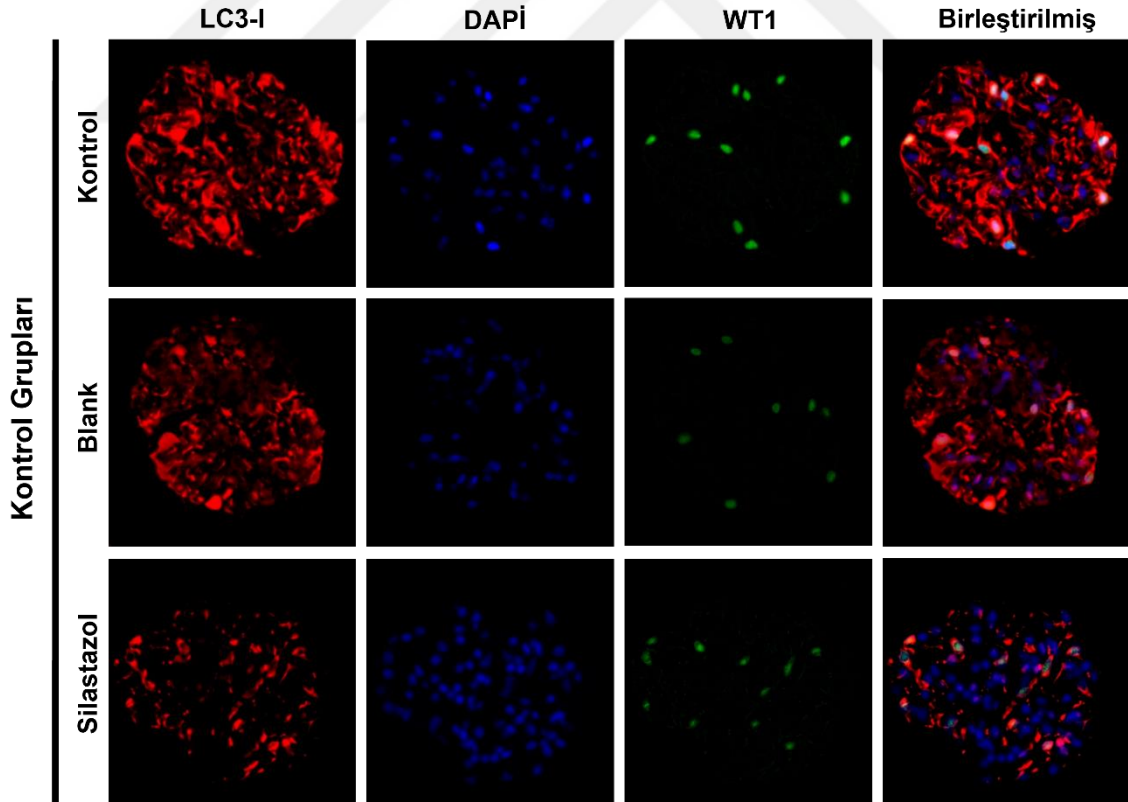
Glomerüler hücrelerdeki otofajik yanıtın gruplar arasında kıyaslanması için LC3-I/WT1 ikili boyaması yapılarak hem glomerüldeki genel otofajik yanıtın seviyesi değerlendirilmiş hem de podosit hücreleri çevresindeki LC3-I pozitifliği incelenerek podosit otofajisi araştırılmıştır (Şekil 4-29, Şekil 4-31, Şekil 4-32). Glomerül genelindeki LC3-I miktarına bakıldığında Kontrol ve *Blank* grupları benzer seviyelerde görülmüştür (Şekil 4-30). Diğer tüm gruplarda Kontrol ve *Blank* grubuna göre azalma meydana gelmiştir. Silastazol ve Glikoz gruplarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunurken en fazla azalma SG ve SGK gruplarında olmuştur.



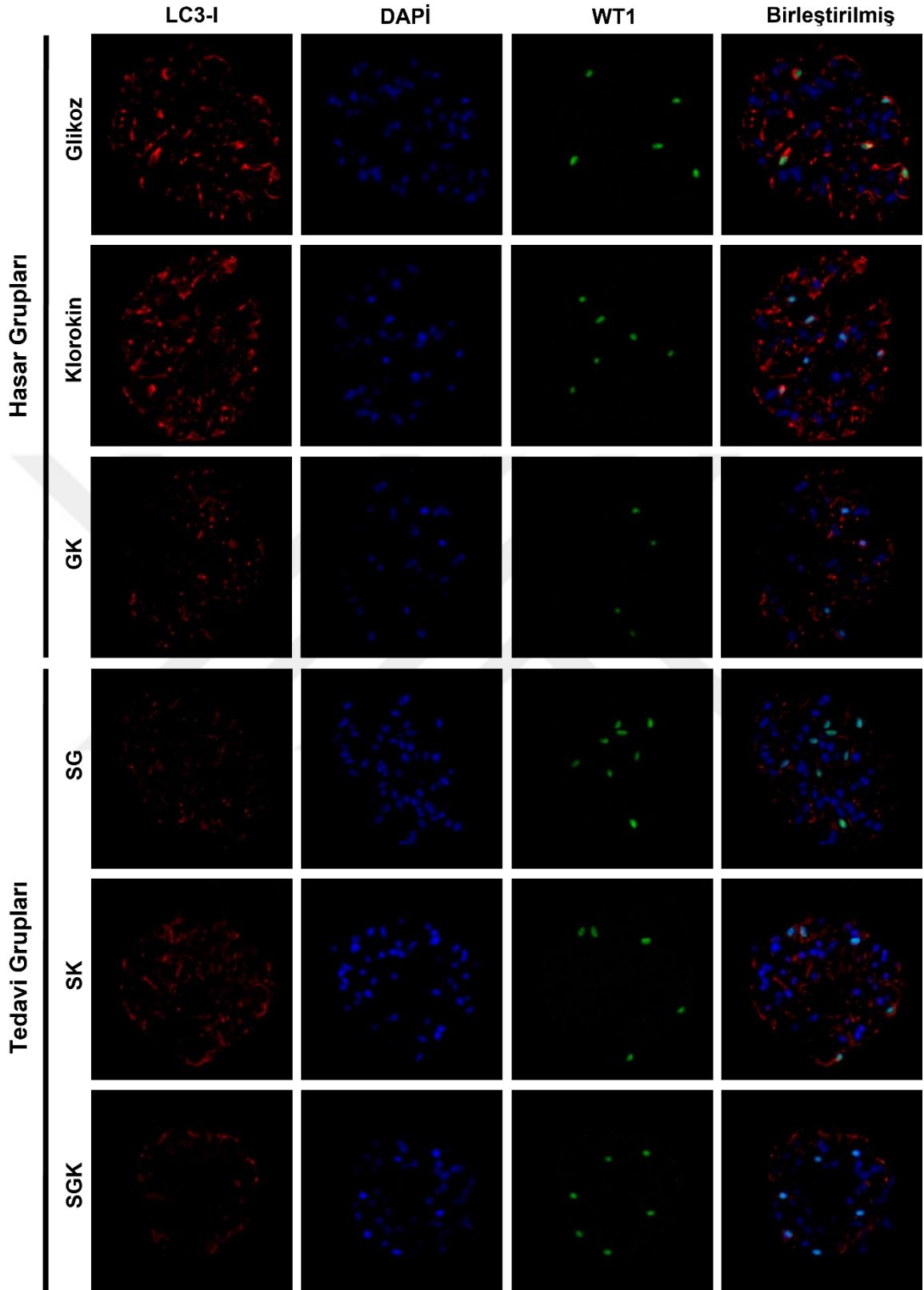
Şekil 4-29: Glomerüllerin LC3-I (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; çekirdek işaretlemesi için DAPI kullanılmıştır, X40 büyütme.)



Şekil 4-30: Glomerüllerdeki LC3-I pozitiflik oranlarını gruplar arası karşılaştırmalı gösteren grafik. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; ns: anlamlı fark yok, * $p<0,05$, * $p<0,0005$, **** $p<0,0001$.)**



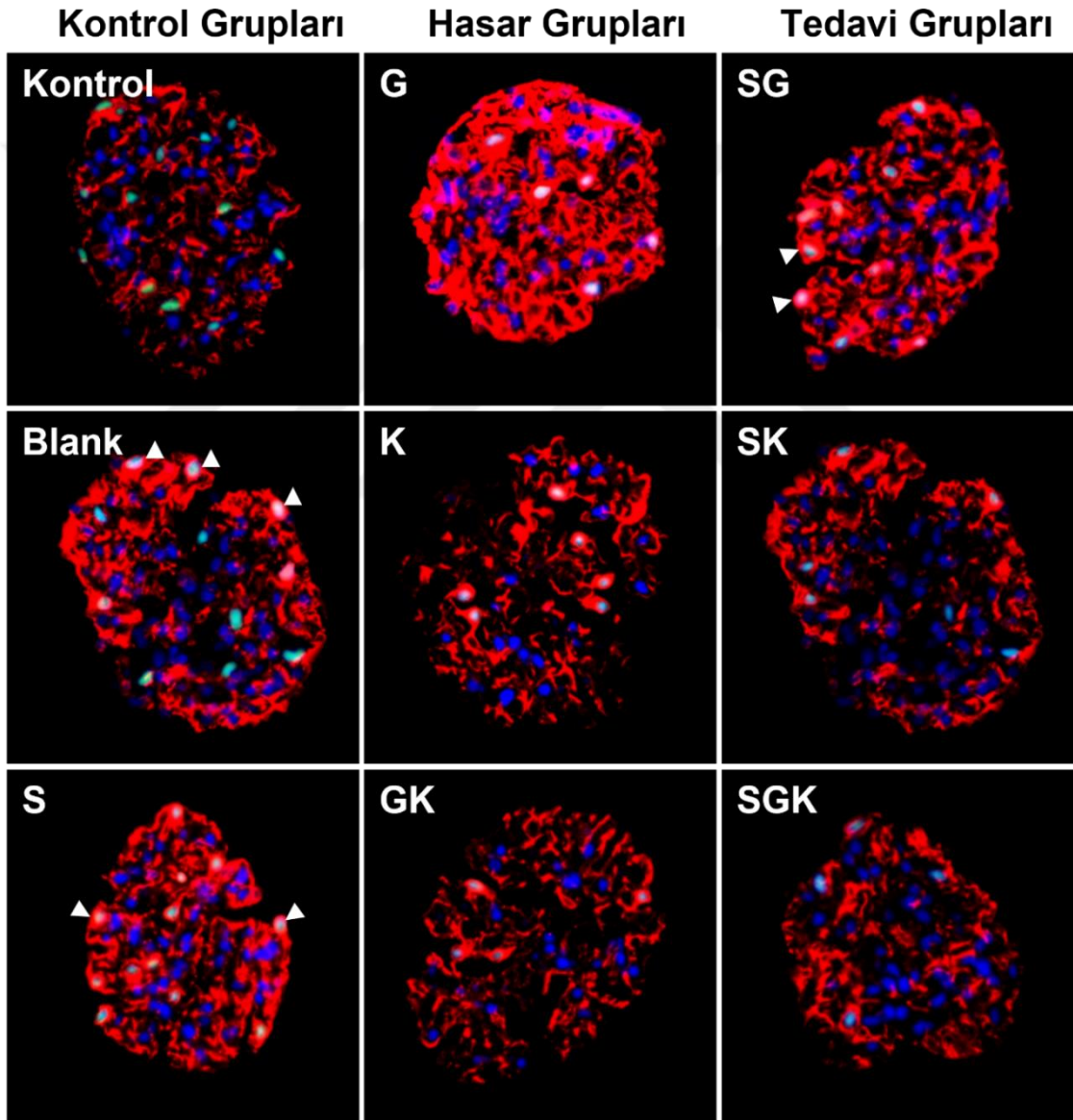
Şekil 4-31: Kontrol grubuna ait glomerüllerin LC3-I (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)



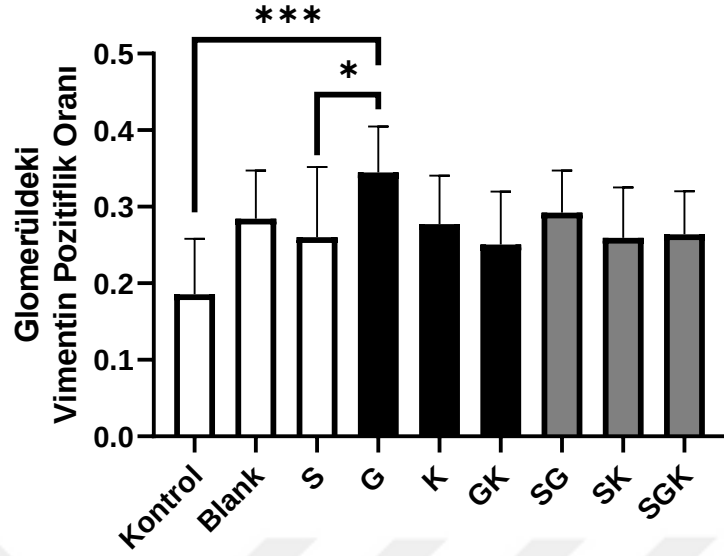
Şekil 4-32: Hasar ve tedavi grubuna ait glomerüllerin LC3-I (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikroyraflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)

4.10. Glomerüllerin Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT) Açısından Değerlendirilmesi: Vimentin/WT1

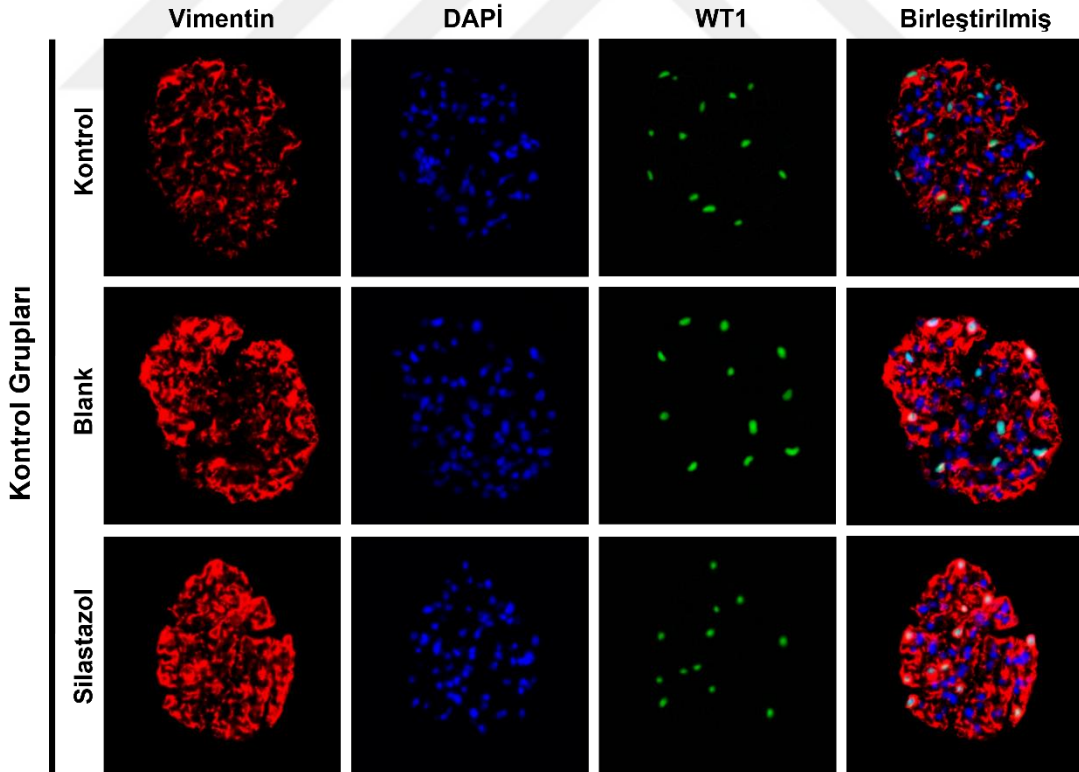
Glomerüler hücrelerdeki EMT'yi tespit için yapılan Vimentin/WT1 boyaması yapıldı (Şekil 4-33, Şekil 4-35, Şekil 4-36). Vimentin ekspresyonunun Kontrol hariç tüm gruplarda, Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdiği görüldü (Şekil 4-34). Kontrol grubuna göre en fazla artış görülen grup ise Glikoz grubu oldu. Glikoz grubunun, Silastazol grubuna göre de daha fazla vimentin pozitifliği içerdiği tespit edildi.



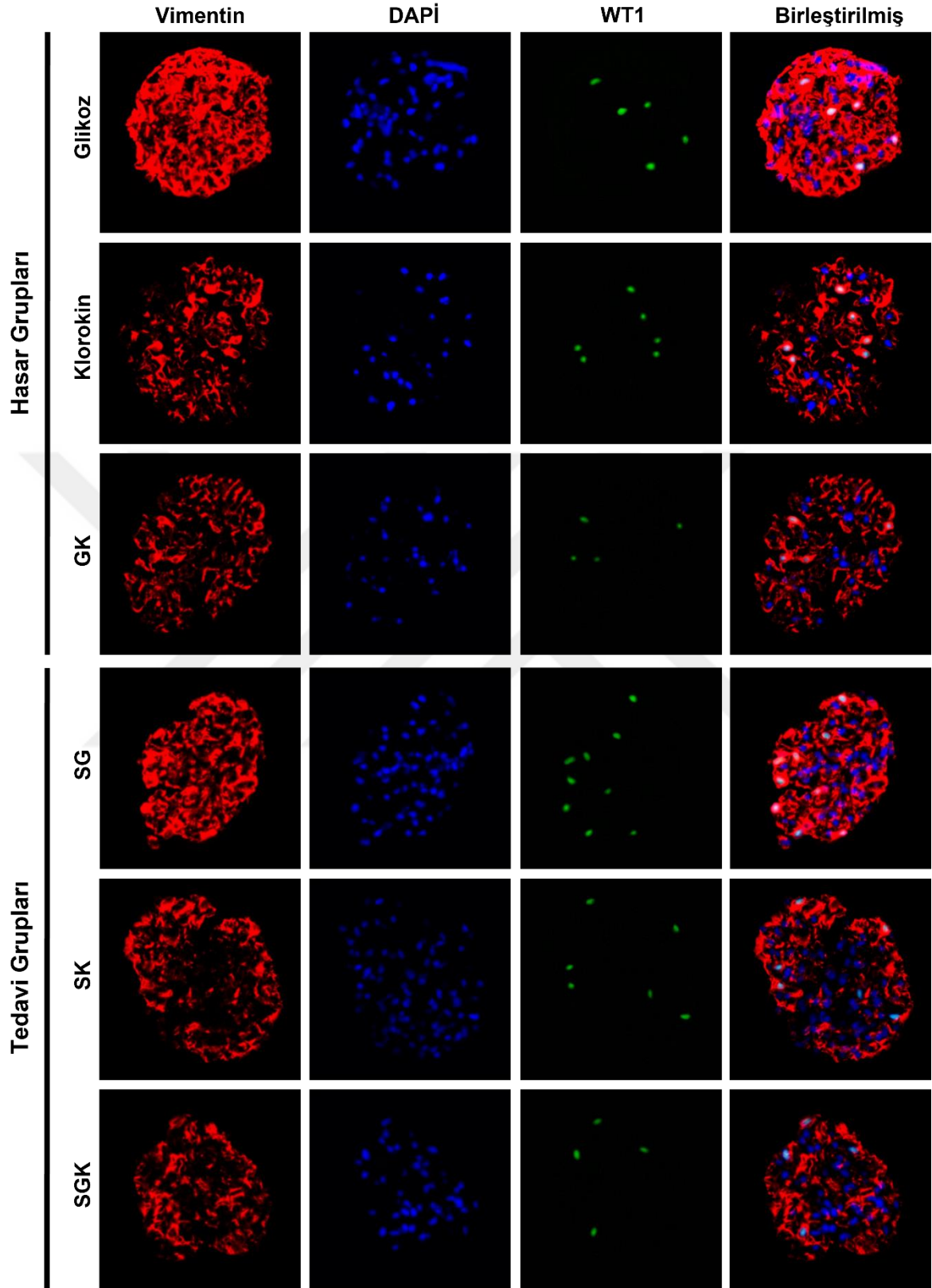
Şekil 4-33: Glomerüllerin vimentin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrogramlar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; çekirdek işaretlemesi için DAPI kullanılmıştır, X40 büyütme.)



Şekil 4-34: Glomerüllerdeki vimentin pozitiflik oranlarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafik. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; *p<0,05, *p<0,0005.)**



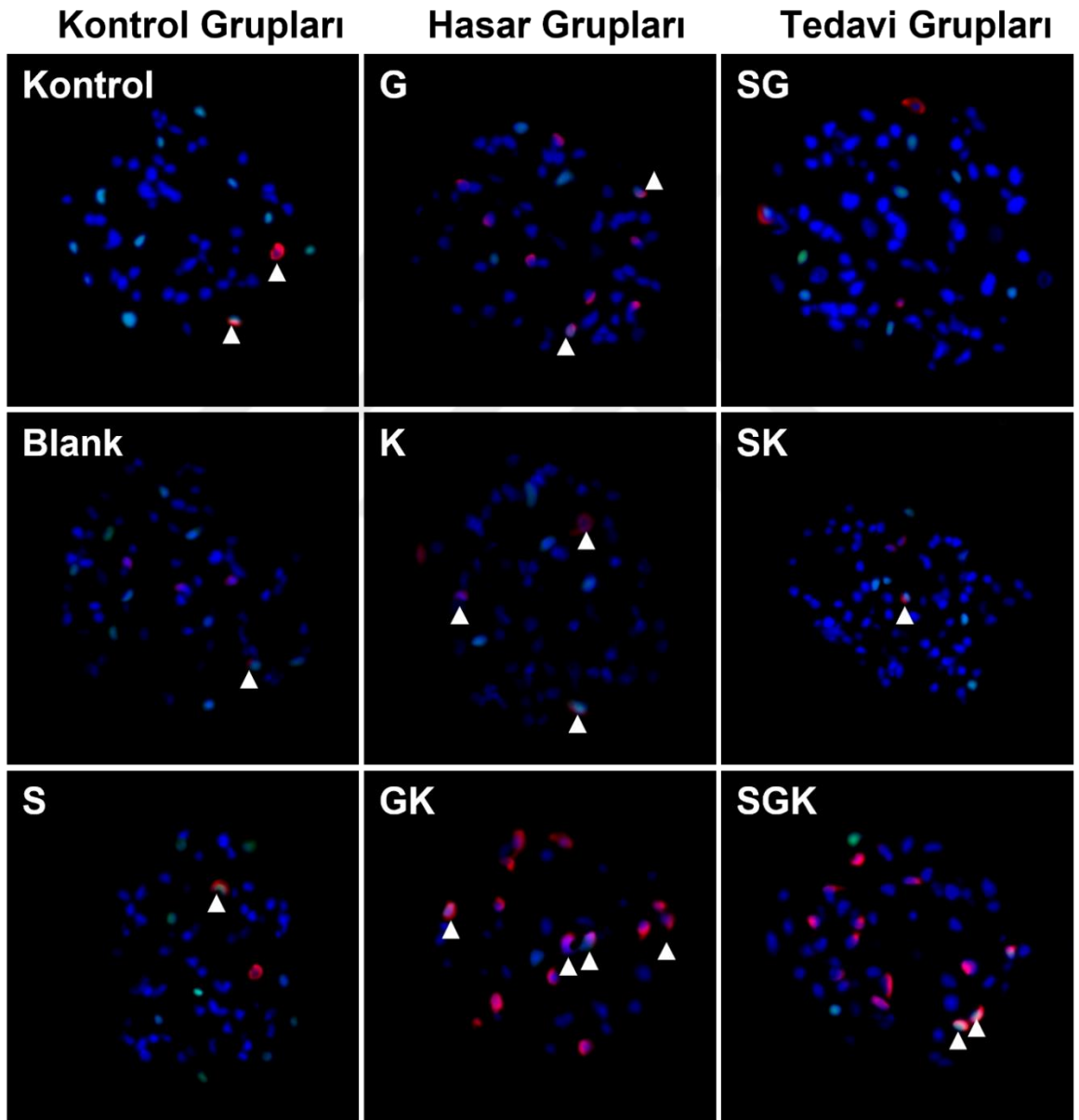
Şekil 4-35: Kontrol grubuna ait glomerüllerin vimentin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)



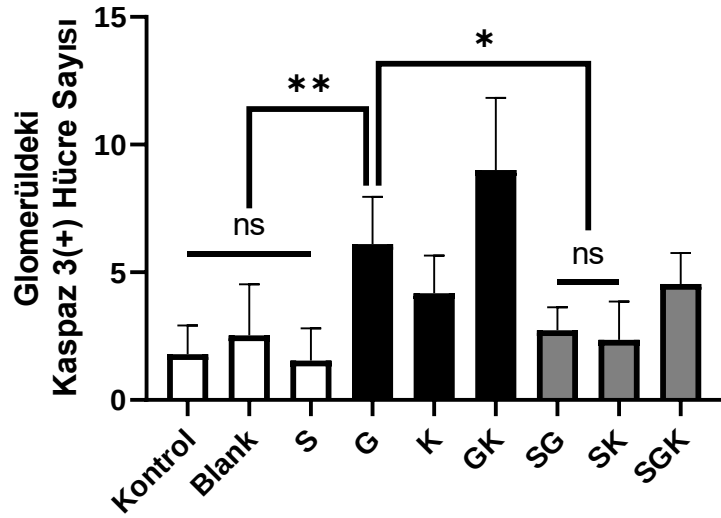
Şekil 4-36: Hasar ve tedavi grubuna ait glomerüllerin vimentin (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)

4.11. Apoptotik Hasar Değerlendirmesi: Kaspaz-3/WT1

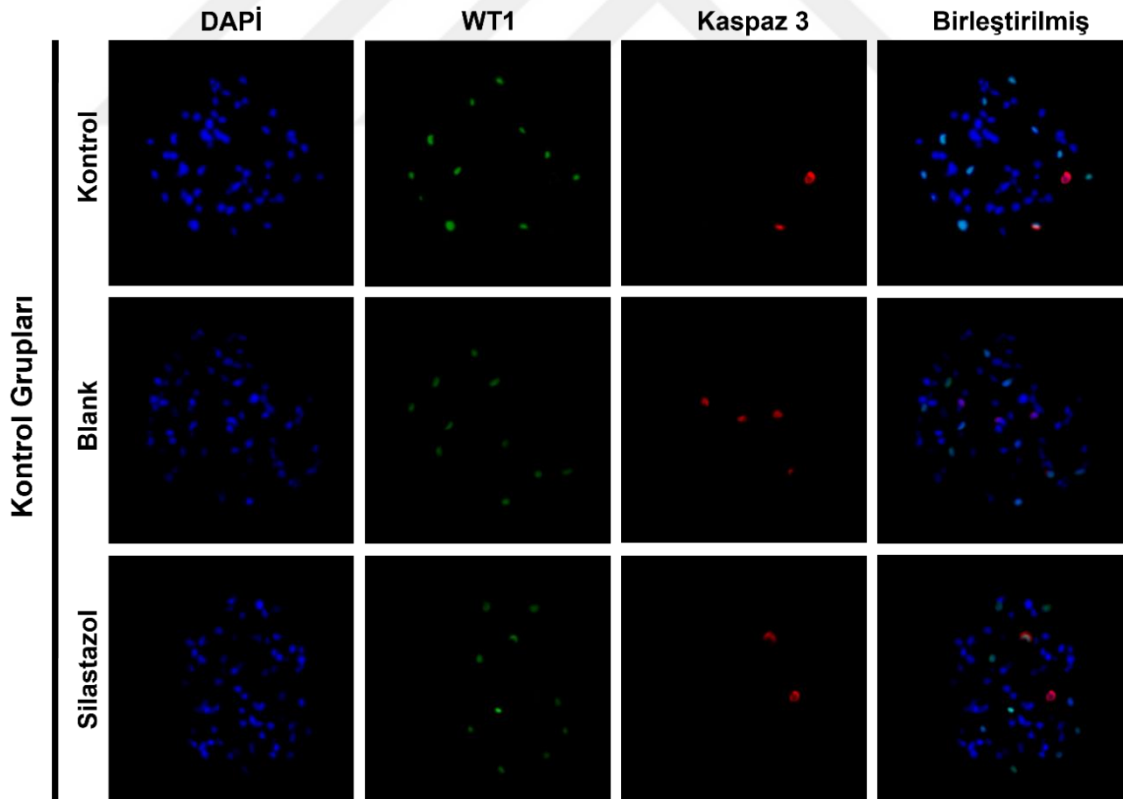
Apoptotik hasar belirteci olarak başvurulmuş kaspaz 3 / WT1 ikili işaretlemesinde en fazla kaspaz 3 pozitif hücre hasar gruplarında tespit edildi (Şekil 4-37, Şekil 4-39, Şekil 4-40). Kontrol grupları birbirlerine benzer seviyelerde iken Glikoz grubunun, kontrol gruplarına oranla anlamlı seviyede daha fazla apoptotik hücre içerdiği görüldü (Şekil 4-38). Tedavi gruplarında hasar gruplarına kıyasla daha az apoptotik hücre sayıldı.



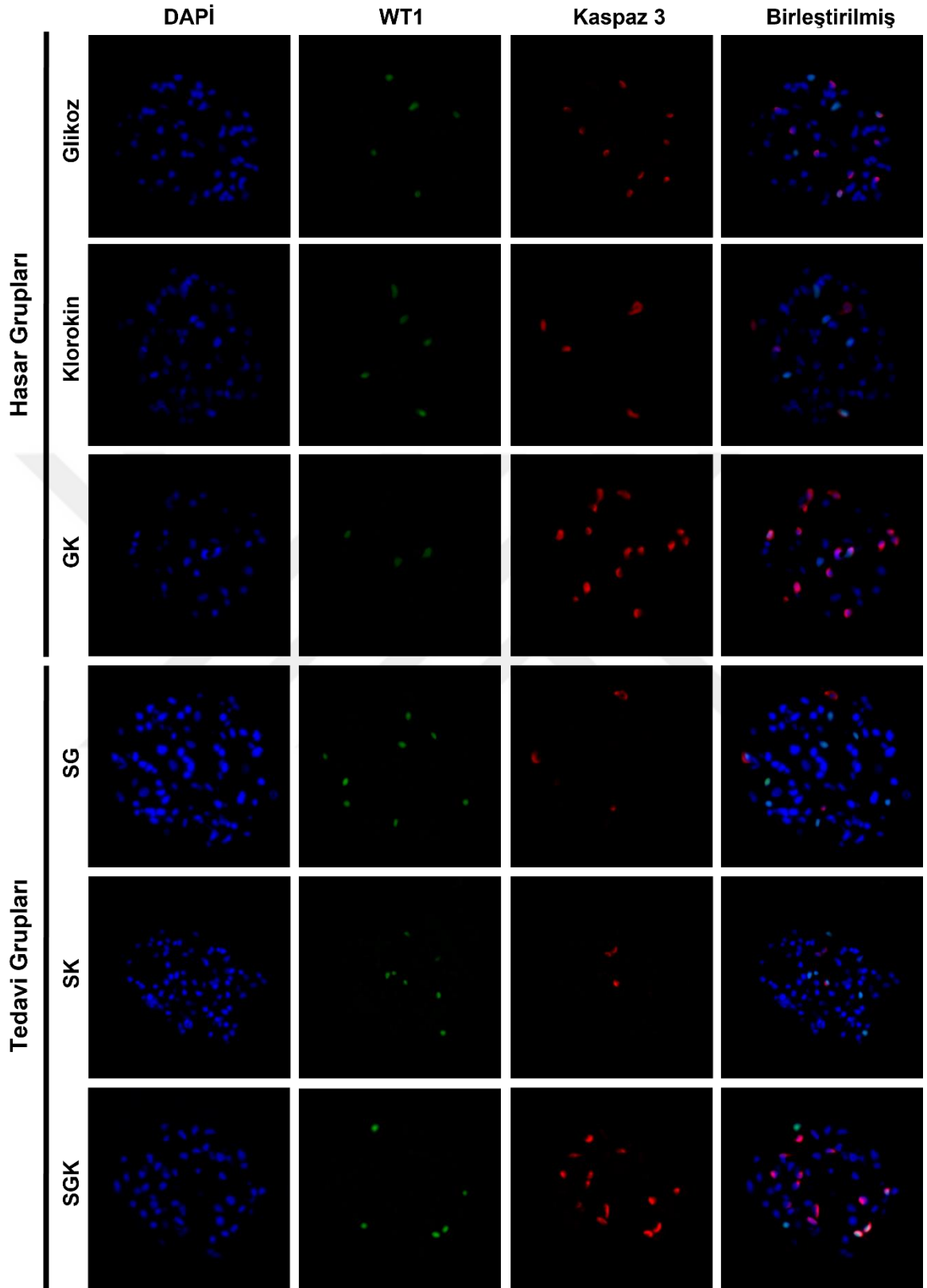
Şekil 4-37: Glomerüllerin kaspaz 3 (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikroyraflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; çekirdek işaretlemesi için DAPİ kullanılmıştır, X40 büyütme.)



Şekil 4-38: Glomerüllerdeki kaspaz 3 pozitif hücre sayılarını gruplar arası karşılaştırmalı gösteren grafik. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; ns: anlamlı fark yok, *p<0,05, **p<0,005.)



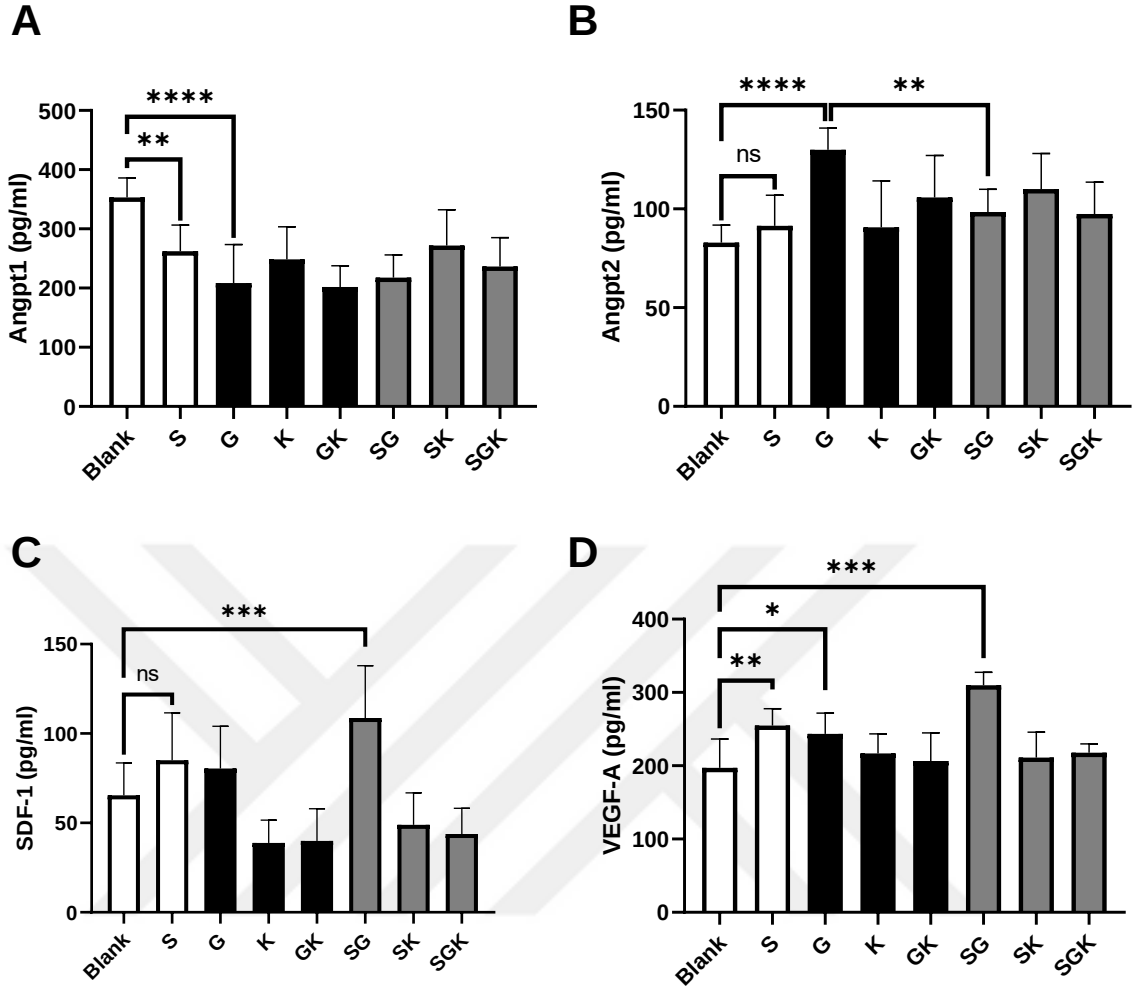
Şekil 4-39: Kontrol grubuna ait glomerüllerin kaspaz 3 (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)



Şekil 4-40: Hasar ve tedavi grubuna ait glomerüllerin kaspaz 3 (kırmızı) ve WT1 (yeşil) ikili immünfloresan işaretlemesini birleştirilmiş olarak gösteren mikrograflar. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; X40 büyütme.)

4.12. Hücreler Arası Etkileşim Faktörlerinin Değerlendirilmesi

Glomerüllerin içinde kültüre edildikleri medyumlar toplandıktan sonra dört etkileşim faktörü açısından incelendi (Şekil 4-41). Podositlerden endotel hücreleri için salgılanan ve endotel stabilizasyonu sağlayan Anjiyopoetin-1 faktörü miktarında *Blank* grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda azalma görüldü (Şekil 4-41A). En fazla azalma Glikoz grubunda görülürken Silastazol grubunda da anlamlı miktarda azalma tespit edildi. Endotel hücrelerindeki destabilizasyonu artıran Anjiyopoetin-2 faktörünün *Blank* ve Silastazol grupları arasında anlamlı fark içermediği, Glikoz grubunda ise önemli oranda artma gösterdiği tespit edildi (Şekil 4-41B). Podositlerden salgılanan SDF-1 faktörü *Blank* grubuna kıyasla Silastazol grubunda artma gösterirken bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4-41C). Silastazol ve Glikoz gruplarında benzer seviyelerde olan SDF-1 miktarı SG grubunda ise *Blank*'e göre önemli oranda artış gösterdi. Podositlerden endotel hücreleri için salgılanan VEGF-A faktörü Silastazol ve Glikoz gruplarında *Blank* grubuna göre anlamlı miktarda artış gösterirken, SG grubundaki artış daha fazla bulundu (Şekil 4-41D). Diğer gruplarla *Blank* grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi.



Şekil 4-41: Glomerüllerin kültüre edildiği medyumdaki Angpt1 (A), Angpt2 (B), SDF-1 (C) ve VEGF-A (D) miktarlarını gruplar arası karşılaştırmalı olarak gösteren grafikler. (S: Silastazol, G: Glikoz, K: Klorokin; GK: Glikoz + Klorokin, SG: Silastazol + Glikoz, SK: Silastazol + Klorokin, SGK: Silastazol + Glikoz + Klorokin; ns: anlamlı fark yok, *p<0,05, **p<0,005, *p<0,0005, ****p<0,0001.)**

5. TARTIŞMA

Diyabet, filtrasyon işleminin gerçekleştiği yer olan glomerüllerde hasar oluşturarak böbrek kaybına sebep olabilmektedir [2, 57]. Diyabetin glomerüllerde sebep olduğu hasarların mekanizması bugüne kadar yaygın bir şekilde çalışılmış olmakla birlikte diyabetik glomerülopati süreci tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Son zamanlardaki çalışmalar ise glomerülü koruyacak intrinsik mekanizmaların tespitine ve glomerüler hücreler arasındaki etkileşime odaklanmıştır [12, 128]. Bugüne kadar en fazla dikkati çeken, glomerülün en hassas elamanı olan podosit hücreleri iken son çalışmalar glomerüler hücrelerin etkileşimler üzerinden birlikte hareketine odaklanmaktadır. Yaptığımız bu tez çalışması endotel hücrelerini indüklediği bilinen silastazol etken maddesinin glomerüller üzerindeki etkilerini araştırmış; korunma, yenilenme ve çoğalma yönünde uyarılan endotel hücrelerinin yüksek glikoz seviyesiyle hasara uğratılmış glomerüller ve özel olarak podositler üzerindeki koruyucu etkileri incelenmiştir.

Çalışmamız glomerüllerin direkt etkilenebilmesi ve gözlemlenebilmesi için *ex-vivo* olarak tasarlanmıştır. Bunun için sağlıklı sıçanların böbreklerinden glomerül izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen glomerüllere yüksek glikoz uygulanarak kültür ortamında diyabetik nefropati (DN) modellemesi yapılmıştır. Silastazolle tedavi grupları oluşturulurken aynı zamanda otofajinin rolünü araştırabilmek için otofaji inhibitörü olan klorokin etken maddesi de kullanılmıştır.

Glomerül araştırmalarında uzun zamandır kullanılmakta olan glomerül izolasyonu yöntemi, çok sayıdaki glomerülü fizyolojik süreçleri ve patolojik durumları açısından eş zamanlı ve direkt inceleyebilmek için sıklıkla başvurulmuş bir yöntemdir. İlk olarak 1954 yılında yayınlanan bir çalışmada sığır böbrek dokusunun farklı büyüklükte açıklıklara sahip eleklerden geçirilmesiyle glomerül dokusunun izole edildiği gösterilmiştir [129]. O günden bugüne geliştirilen ve hassaslaştırılan fiziksel kuvvetle elekten geçirme yönteminin yanı sıra manyetik boncuk kullanımı gibi farklı yöntemlerle de glomerül izolasyonu yapıldığı gösterilmiştir [130]. Bununla birlikte klasik yöntem sadeliği ve maddi olarak külfet getirmeyişi sebebiyle kullanılmaya devam etmektedir [26]. Glomerül izolasyonunda önem arz eden noktalar

izolasyon süresi ve izolasyon verimidir. Glomerül izolasyonu sonrası glomerüller hücrelerin apoptoza uğramaya başladığı gösterildiğinden dolayı izolasyon süresinin kısa tutulması ve uygun şartlarda kültüre edilmeleri büyük önem arz etmektedir [131]. Çalışmamızdaki izolasyon süreci 1 saat kadar kısa sürede tamamlanmış ve izole edilen glomerüller %10 FBS içeren DMEM ile elekten toplanarak yine aynı medyum içerisinde kültüre edilmiştir. Diğer önemli nokta olan izolasyon verimi, böbrek başına izole edilen glomerül sayısının yüksek olması ve izole edilen glomerüllerin tübül veya bağ doku parçalarını olabildiğince az içermesidir. Sıçanlardan yapılan glomerül izolasyonlarının glomerül saflığı bugüne kadar yapılan çalışmalarda %85 - %95 arasında olmuştur [26]. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz %95 saflık izolasyonun başarısını göstermiştir. Ayrıca izolasyon yöntemi olarak referans aldığımız çalışmada elde edilebilen glomerül miktarı böbrek başına 6000 - 10000 olarak belirtilmiştir [123]. Bizim gerçekleştirdiğimiz izolasyon ise böbrekteki tüm glomerüllerin üçte birini kapsayacak şekilde böbrek başına yaklaşık 10500 glomerül sonucunu vermiş ve son derece başarılı olmuştur. Bu başarı, izolasyon sürecinde glomerül içeren sıvılara temas eden tüm aletlerin %1'lik BSA ile önceden muamele edilmiş olması ve tek seferde çok sayıda böbrek çalışılmış olması sayesinde yakalanmıştır. Böylece izolasyon işlemleri esnasında glomerüllerin istenmeyen yapışmalarla kaybedilmesi en asgari seviyeye indirilmiştir. Ayrıca Rush ve diğ. [123] tarafından gerçekleştirildiği gibi bizim çalışmamızda da glomerüllerin çoğunluğu kapsülünden ayrılmış olarak elde edilmiş böylece glomerüllerin benzer şartlar altında kültürlenmesi sağlanmıştır.

Yapılan Hematoksilen & Eozin (H&E) boyamasıyla hem kültürlenmeden direkt takip edilen (Kontrol) hem de herhangi bir etken madde uygulanmadan kültürlenilen (*Blank*) glomerüller incelendiğinde glomerüllerin çoğunluğunun yapı bütünlüğünü koruduğu görüldü. Böylece hem izolasyonun hem de kültürleme işleminin başarılı olduğu teyit edildi. Deney gruplarına ait H&E boyamaları incelendiğinde genel olarak glomerüllerin formunu koruduğu görüldü. Bununla birlikte artan hasara bağlı olarak GK ve SGK grupları başta olmak üzere hasar ve tedavi gruplarında piknotik ve karyolitik çekirdekler tespit edildi. En yoğun hasar hem glikozun oluşturduğu stresin hem de otofaji inhibisyonun çifte etkisi olarak GK grubunda izlendi.

Glomerüllerde DN'nin sebep olduğu bilinen bazı histopatolojik ve ultrastrüktürel bulgular tanımlanmıştır. Mezengiyal alanda genişleme, mezengiyal matriks birikimi bu bulgulardan birisidir [59, 76]. Ex-vivo kültür ortamında yaptığımız diyabetik nefropati modellemesinden elde edilen glomerüller mezengiyal alan miktarını tayin için yapılan Periyodik Asit Schiff

Hematoksilen kombine boyaması ile incelendiğinde Kontrol, *Blank* ve Silastazol grubu glomerüller arasında belirgin bir fark tespit edilmemişken en fazla mezengiyal alan artışı Glikoz ve SG grubunda tespit edilmiştir. SG grubundaki mezengiyal alan artışı Glikoz grubundaki artıştan daha az olmuştur. Çalışmamızdaki bu sonuç silastazolün mezengiyal hücrelerde TGF-B seviyesini düzenlediği bulgusunu desteklemiştir [114]. GK hariç diğer hasar ve deney gruplarında da anlamlı miktarda mezengiyal alan artışı varken GK grubunda belirgin artış olmayışı, GK grubu glomerüllerde yüksek hasar sebebiyle oluşan dejenerasyonun boyutlarını göstermiştir.

Yüksek glikoz seviyesinin glomerüller üzerindeki etkilerinden birisi de glomerül hipertrofisidir [59]. Glomerüler hipertrofiyi araştırmak için glomerüllerin alan ölçümleri yapıldığında Kontrol, *Blank* ve Silastazol grupları benzer büyüklük değerleri verirken hasar ve tedavi gruplarının tamamı anlamlı oranda büyük bulunmuştur. Glikozla muamele edilen gruplardaki alan artışı glikozun glomerüllerde sebep olduğu hipertrofiye işaret ederken klorokin glomerüler hücreler de oluşturduğu stres sebebiyle glomerüller kompakt yapısını koruyamayarak genişlemeye uğramıştır. Glomerüler alan artışıyla beraber, glomerüllerdeki toplam hücre sayısı da incelenerek glomerüler hücre miktarının glomerüler genişlemeye etkisi değerlendirildi. Silastazolün endotelial hücreler üzerinde proliferatif etkisi olduğu bilinmektedir [109]. Ayrıca silastazolün mezengiyal hücreler üzerinde anti-apoptotik etki gösterdiği kaydedilmiştir [117]. Yapılan gruplar arası karşılaştırmada Kontrol ve *Blank* grubu arasında bir fark görülmedi. Silastazol grubunda daha fazla hücre tespit edilmesi silastazolün glomerüler hücreler üzerindeki koruyucu ve proliferatif etkisini ortaya koymaktadır. Glikoz grubunda ise hücre miktarında azalma tespit edildi. Glikozun mezengiyal hücrelerde çoğalmaya sebep olduğu bilinmektedir [132]. Bu çoğalma durumuna rağmen Glikoz grubunda hücre sayısında artış değil de azalma olduğu görüldü. Bu durum hem endotelial hücrelerin fazla miktarda kaybedilmiş olmasını hem de podosit kaybını göstermektedir. SG grubunda ise silastazolün endotel koruyucu ve indükleyici etkisiyle beraber hem Glikoz grubuna göre hem de *Blank* gruba göre anlamlı oranda daha fazla hücre bulunduğu görüldü. Klorokin, SK, GK ve SGK gruplarının ise Kontrol ve *Blank* gruplarına benzer seviyede hücre içerdiği tespit edildi. S ve SK gruplarının arasında belirgin fark oluşu otofajik akışı durdurulmuş endotelial hücrelerde proliferasyonun engellendiğini göstermektedir.

Diyabetik glomerülopatilerde podositler başta olmak üzere tüm glomerüler hücreler nekroz, apoptoz veya otofaji ilişkili programlı hücre ölümüne uğrayabilmektedir [133]. Literatürdeki

çalışmaların çoğunluğu podosit tükenmesine sebep olan podosit apoptozuna odaklanmaktadır [128, 134]. Bununla birlikte apoptoz, özellikle diyabetik nefropatide olmak üzere glomerüler endotel hücreleri için de önemli bir uğraktır [135, 136]. Bu diyabetik bulguların yanı sıra izole edilen glomerüllerde apoptoz başlangıcı meydana geldiği bilindiğinden [131] *ex-vivo* olarak kültürlediğimiz glomerüllerde hücre ölümüne giden hücrelerin varlığını tespit için Kaspaz 3 / WT1 ikili işaretlemesi yaptık. Kontrol, *Blank* ve Silastazol gruplarında apoptoz indüklenmiş çok az hücre bulunurken bu hücrelerin Glikoz, Klorokin ve GK gruplarında anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü. Silastazol verilen tedavi gruplarında ise apoptotik hücrelerin azaldığı tespit edildi. SG grubundaki azalma silastazolün yüksek glikoz seviyesinden kaynaklanan apoptozu engellediğini gösterirken anlamlı olmamakla birlikte SK grubundaki azalma da otofajik sürecin bozulmasından kaynaklanan apoptozu karşı silastazolün koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir. Silastazolle yapılan bir çalışma silastazolün alkol kaynaklı hepatosit apoptozunu engellediğini gösterirken başka bir çalışma silastazolün hepatosellüler karsinomda apoptozu indüklediği yönünde bulgular paylaşmıştır [137, 138]. Biz ise bu çalışmamızda silastazolün glomerüler hücreleri apoptozdan koruduğu tespit ettik.

Endotel hücreleri fizyolojik şartlar altında tamamen epitel karakterde iken podositler hem epitel hem de mezenkimal özellik taşımaktadır [139]. Bu sebeple hem podositlerde hem de tamamen mezenkimal karakter taşıyan mezengiyal hücrelerde mezenkimal bir belirteç olan vimentin ekspresyonu görülür [140]. Glomerüllerde hasar oluşması durumunda podositler ve endotel hücreleri epitel özelliklerinde azalma mezenkimal özelliklerinde artma sergilerler [139, 141, 142]. Vimentin / WT1 ikili işaretlemesi değerlendirildiğinde *Blank* grubundaki pozitifliğin Kontrol grubuna kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum kültüre edilen glomerüllerdeki hücrelerin kültür ortamında epitelyal özelliklerinde azalma mezenkimal özelliklerinde artma yaşadığını göstermektedir. İstatiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen Silastazol grubundaki vimentin pozitifliğinin *Blank* grubundan az olması silastazolün endotel hücrelerini epitel karakterde korumaya yardımcı olduğunu düşündürmektedir. Yine benzer şekilde glikoz grubunda belirgin şekilde artan vimentin ekspresyonu, SG grubunda daha az bulunmuştur. Klorokin uygulanan gruplarda *Blank* gruba göre herhangi anlamlı bir değişim görülmemiştir.

Diyabetik glomerülopatilerde ultrastrüktürel hasarlar olduğu bilinmektedir. Glomerüler bazal membran kalınlaşması, podosit hipertrofisi ve pedisel geri çekilmesi bunların önde gelenleridir [77, 86]. Elektron mikroskopik incelemelerde Kontrol, *Blank* ve Silastazol grubuna ait

glomerüllerde ultrastrüktürel yapının genel olarak korunduğu görüldü. Gruplar arası ultrastrüktürel morfolometrik değerlendirme olarak GBM kalınlıkları ölçüldü. Glikoz içeren gruplarda beklendiği üzere GBM’de kalınlaşma tespit edildi. Glikoz grubunda ortalama 235 nm olarak ölçülen GBM kalınlığının, *in vivo* diyabet modelindeki GBM kalınlaşmayla (250 nm) kıyaslandığında daha az olduğu görüldü [127]. Silastazol ve klorokin içeren grupların kontrol gruplarına yakın GBM kalınlığı göstermesi bu etken maddelerin glomerül üzerindeki etkilerinin ilk etapta GBM’yi etkilemediğini ortaya koymaktadır. SG grubundaki glomerüllerin GBM kalınlıklarının Glikoz grubundaki kadar artmış olmaması silastazolün GBM üzerinde stabilize edici bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Diyabetik nefropatinin ultrastrüktürel bulgularından birisi de podosit pedisellerindeki geri çekilme olarak tanımlanan ve genişlemiş pediseller olarak izlenen durumdur [85]. Gruplar bu bulgular açısından araştırıldığında kontrol gruplarında pedisellerin gelişmiş yapısının ve GBM’yle bağlantısının korunduğu görülürken glikoza maruz bırakılarak diyabet modellemesi yapılan ve klorokin uygulamasıyla hasar gören grupların tümünde genişlemiş pediseller yerine GBM’yle bağlantısı kopmuş ve değişik oranlarda dejenerasyon gösteren pediseller olduğu tespit edildi. Bu çalışma, kültür ortamında hasar gören podositlerin pedisel geri çekilmesi yerine GBM’den kopmaya uğradığını göstermiş oldu. Hasar grupları ve tedavi grupları birbiriyle kıyaslandığında bu dejenerasyonların tedavi gruplarında daha az olduğu izlendi.

Podositlerde yapılan otofagozom incelemelerinde çift membranlı ve lameller yapı gösteren klasik tipte otofajik veziküllerin varlığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [88, 93]. Bununla birlikte Sato ve diğ. [143] tarafından böbrek biyopsileri üzerinde yapılan otofaji araştırmasında podositlerde 2 tip otofaji gerçekleştiği, klasik çift membranlı otofajik vakuollerin yanı sıra yoğunlaşmış ribozomların bulunduğu membranlar ile de otofaji gerçekleştiği öne sürülmüştür. Çalışmamızda klorokin uygulanan gruplarda otofagozom varlığı araştırıldığında klasik tipteki çift membranlı otofagozom yapılarla birlikte üzeri ribozomla kaplı genişlemiş veziküler yapılar da tespit edildi. Bu veziküllerin hasar görmüş mitokondrilerle yakın bulunduğu görüldü.

Nefrin slit diyafram proteinlerinin en önde gelenidir ve hasar durumlarında glomerüldeki miktarının azaldığı bilinmektedir [86, 144]. Stres altına giren glomerüllerde slit diyaframdan hücre içine alınan ve hücre gövdesinde biriken nefrin, podosit hücrelerinin iyileşmesi için gereklidir [145]. WT1 ile tespit edilen podosit hücreleri ise glomerül hasarının en kritik

noktasıdır [146, 147]. Diyabetik nefropatide meydana gelen podosit kaybı kronik böbrek yetmezliğinin temel nedenidir [82]. Yüksek glikoz seviyesi gibi otofaji inhibisyonun da podosit kaybına sebep olduğu bilinmektedir [10, 85]. Glomerülün podosit kaybına uğramaması glomerül korunumu için son derece önemlidir. Silastazolün glomerül üzerinde koruyucu etkileri bu parametreler açısından Nefrin ve WT1 ikili işaretlemesiyle araştırılmıştır. Kontrol ve *Blank* grubuna ait glomerüller karşılaştırıldığında podosit ve nefrin miktarı bakımından anlamlı fark tespit edilmemiştir. Bu sonuç *ex-vivo* kültür sürecinin başarılı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte *Blank* grubunda nefrin ekspresyonunun podosit hücre gövdelerinde yoğunlaştığı görülmüştür. Bu durum kültür ortamına giren glomerüllerin yaşadığı stresi ortaya koymuştur. Silastazol grubunda da podosit çevresinde nefrin birikimi olmakla birlikte nefrin ekspresyonunun *Blank* gruba göre daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. Böylece silastazolün nefrinin stabil ekspresyonunda etkili olduğu gösterilmiştir. Glikoz ve Klorokin uygulanan tüm gruplarda ise nefrin miktarı önemli oranda düşüş göstermiştir. Benzer şekilde bu hasar gruplarında podosit sayısı belirgin oranda azalmıştır. En fazla podosit kaybı, hasarın en fazla izlendiği GK grubunda olmuştur. GK grubundaki bu durum hem yüksek glikoz seviyesinin hem de otofaji baskılanmasının bir sonucudur. Glikoz grubuyla kıyaslandığında SG grubunda hem nefrin kaybının hem de podosit kaybının daha az olduğu görülmüştür. Bu durum silastazolün glikoz uygulamasıyla beraber podositlerde oluşan stresin etkilerini hafiflettiğini glomerül özelinde ispat etmiştir. Nefrin ekspresyonu açısından *Blank* grubu ile K Grubu, S grubu ile SK grubu ve SG grubu ile SGK grubu karşılaştırıldığında klorokinle otofaji durdurulduğunda nefrindeki korunmanın belirgin oranda azaldığı görülmüştür. Çalışmamızın bu bulgusu otofaji ile nefrinin yakın ilişkisini morfolojik olarak göstermesi bakımından önemlidir. Nefrinin podosit içerisinde devir daim ettiği bilinmektedir [148]. Spitz ve diğ. [149] tarafından 2022 yılında yapılan bir çalışmada ise meyve sineklerinin podosit benzeri nefrosit hücrelerinde nefrin karşılığı olan *sns* proteininin slit diyaframdaki yoğunluğunu otofajik aktivitenin düzenlediği gösterilmiştir. Bununla birlikte fazlaca dejenerasyon gösteren GK grubu hariç bakıldığında hasar ve tedavi grupları arasında podosit miktarı açısından belirgin bir fark izlenmemiş olması silastazolün koruyucu etkilerinin bir bütün olarak hücre korunumuna etki etmediğini göstermiştir.

Podosit hücre gövdesinde eksprese olan sinaptopodin nefrine göre daha stabil bir podosit belirtecidir [50]. Nefrin ekspresyonu podosit hasarının ilk anlarından itibaren kaybedilirken sinaptopodin ekspresyonu podositin kaybedilme anına kadar korunmaktadır [52]. Buna karşın

endotel hücre belirteci olan CD31'in ilk hasar anından itibaren kayba uğradığı bilinmektedir [150]. Glomerüllerdeki podosit ve endotel hücrelerinin dağılımını değerlendirmek için yapılan Sinaptopodin/CD31 ikili boyaması, kültür ortamına alınan glomerüllerin sinaptopodin miktarı bakımından korunurken CD31 pozitifliği açısından zayıflamıştır. Bu durum izolasyon sonrası kültür ortamına alınan glomerüllerde ilk olarak endotel hücrelerinin dejenerasyona uğradığını göstermiştir. Çalışmamızın önemli bir bulgusu olarak Silastazol grubunda CD31 pozitifliğinin Kontrol grubuna yakın olması silastazolün bu dejenerasyonu engellediğini ve endotel hücrelerini kültür ortamında koruduğunu göstermiştir. CD31 pozitifliği Glikoz grubu başta olmak üzere hasar gruplarında yüksek oranda azalmış olarak bulunmuştur. SG grubunda anlamlı miktarda CD31 korunumu olurken SGK grubuna gelindiğinde bu korunumun ortadan kalkması silastazolün glomerüler endotel hücrelerini korumasında otofajinin etkin olduğunu ortaya koymuştur.

Glomerülün ve glomerüler hücrelerin bütünlüklerini korumasından daha önemli olan glomerüler filtrasyon bariyerinin (GFB) fonksiyonelliğini devam ettirmesidir [67]. Slit diyafram proteini olan nefrin ve CD31 bu bariyerin iki önemli elemanıdır [39]. Filtrasyon biriminin fonksiyonel olma durumu Nefrin – CD31 ikili işaretlemesiyle kontrol edilmektedir. *Ex-vivo* olarak kültürlediğimiz glomerüller nefrin CD31 kolokalizasyonu açısından incelendiğinde *Blank* grubunun Kontrol grubuna göre daha az nefrin CD31 kolokalizasyonu içerdiği görüldü. *Blank* olarak kültüre edilen glomerüllerde CD31 ekspresyonunun azaldığı gösterilmişti. Böylece nefrin CD31 kolokalizasyonundaki bu azalmanın CD31 pozitifliğindeki azalmayla paralellik gösterdiğini, CD31 pozitif alanlardaki azalmanın nefrin CD31 birlikteliğini bozduğunu gösterdik. Fakat kültüre edilen glomerüllere silastazol verildiği durumda nefrin CD31 kolokalizasyonu Kontrol grubuna yakın değerlerde bulundu. Buradan hareketle endotel hücrelerinin korunduğu bölgelerde podosit slit diyaframlarının da korunduğunu ve böylece GFB fonksiyonel kaldığını göstermiş olduk. Hasar oluşturulan tüm gruplarda ise azalan nefrin ve CD31 ekspresyonuna paralel olarak kolokalizasyon bulgularının da azaldığını tespit ettik. Fakat glikoz grubunda yok denilecek seviyelere inen kolokalizasyon, SG grubunda Kontrol seviyesine yaklaşmış olarak bulundu. Bu bulgular silastazol yardımıyla korunan endotel bölge ile nefrin pozitif bölgelerin GFB'yi koruyacak şekilde daha fazla örtüştüğünü gösterdi. Endotelial hücrelerden salgılanan faktörlerin ve eksozomların podosit protein ekspresyonlarını etkilediği bilinmektedir [151, 152]. Bizim çalışmamız bu verileri morfolojik olarak göstermiş olması bakımından son derece önemlidir.

Fizyolojik şartlarda glomerüllerde proliferatif hücreye rastlanmamakta ve hatta glomerüllerdeki proliferasyon bulguları da patolojik olarak değerlendirilmektedir [153, 154]. Fakat diyabetik nefropatiden paryetal epitel hücrelerin ve mezengiyal hücrelerin çoğalma yönünde uyarıldığı bilinmektedir [155]. Mezengiyal hücrelerin çoğalması sıkça rastlanan bir durumken endotel hücrelerinin de çoğaldığı ve anjiyogenez başlattığı görülmüştür [64, 72, 156]. Silastazolün endotel hücrelerini indükleyerek yeni endotel ve kapiller tüp oluşumunu desteklediği bilinmektedir [157]. Bu sebeple silastazol kullanarak oluşturduğumuz deney gruplarındaki glomerülleri çoğalma belirteci yönünden inceledik. Bunun için Ki67/CD31 ikili işaretlemesi yaparak hem glomerüllerdeki genel proliferatif karakter artışını hem de endotel hücrelerinde Ki67 pozitifliği durumunu değerlendirdik. Kontrol grubu dahil tüm gruplarda Ki67 (+) hücrelere rastlandı. Böylece bu çalışmamız izolasyon sürecinin glomerüllerde oluşturduğu stresin bir sonucu olarak izole edilen glomerüllerde proliferatif karakterde hücrelerin bulunabileceğini göstermiş oldu. *Blank* grubunda ve Silastazol grubunda Ki67 (+) hücre sayısında görülen artışlar kültür ortamına glomerüllerin uyum sağlaması olarak değerlendirilirken Silastazol grubunda belirgin artış olması silastazolün glomerüler endotel hücreleri üzerindeki proliferatif etkisini gösterdi. Glikoz grubunda da Ki67 pozitif hücre miktarı artmışken en fazla artış silastazol ve glikozun beraber verildiği SG grubunda meydana geldi. Klorokin uygulanan gruplarda proliferatif karakter daha az olarak seyredildi. Glikoz grubundaki proliferatif hücreler çoğunlukla mezengiyal alan bölgesinde tespit edilirken silastazol verilen gruplarda kapiller alanlara yakın bölgelerde pozitiflik tespit edildi. Silastazolün bu etkisi daha önce farklı dokularda gösterilmiş olsa da glomerülde ilk defa bizim bu çalışmamızla ortaya konmuş oldu. Bu bulguyla birlikte ayrıca SG grubunda endotel ve podosit korunumunun daha fazla olması sebebiyle silastazolün endotel hücrelere olan bu etkisinin glomerülü diyabetin getirdiği hasarlardan koruduğunu düşünmekteyiz.

Tüm hücre tipleri için önemli bir süreç olan otofaji glomerül özelinde bugüne kadar çoğunlukla podositlerde araştırılmıştır. Podositlerin bazal otofajik seviyesinin yüksek oluşu otofajiyi glomerül hayatıyeti için önemli kılmaktadır [89]. Otofajinin özellikle diyabet sürecinde olmak üzere endotel hücreleri için de fevkalade önemli olduğu gösterilmiştir [158–160]. Otofaji aktivasyonunda rol alan Atg5'in podositlere spesifik susturulması podositopati, artan proteinüri ve glomerüloskleroza sebep olurken aynı şekilde endotel hücrelerinde susturulması da kapiller yoğunluğunda azalmaya ve hızlanmış DN sürecine sebep olmuştur [92]. Bu bakımdan glomerüler endotel hücrelerinde yapılacak otofaji araştırmaları büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda bu alana katkı sağlamak üzere glomerüldeki otofajik yanıt durumunu değerlendirdik. Bunun için yaptığımız LC3-I/WT1 ikili işaretlemesinde otofajik akışın hızlandığı gruplar LC3-I pozitifliğindeki azalmayla ortaya çıkmış olmaktadır [161, 162]. Otofajik akışın durdurulduğu durumlarda hücre içindeki LC3-I, LC3-II'ye çevrilerek otofagozomlar oluşturulabilirken otofagozomlar sindirilmediği için LC3-II'nin LC3-I'e geri çevrilmesi mümkün olmamaktadır [163, 164]. Klorokin etken maddesinin otofagozomların otolizozomlara geçişini durdurarak otofajik döngüyü kestiği bilinmektedir [165]. Bu durumda klorokin verilen gruplarda görülen azalmış LC3-I pozitifliği otofajik akışın kesildiğini teyit etmiş olmaktadır.

Çalışmamızda en fazla LC3-I pozitifliği Kontrol grubunda tespit edilirken *Blank* ve Silastazol gruplarında Kontrol grubuna kıyasla azalması bu gruplarda otofajik sürecin hızlandığını göstermiştir. Bu durum izolasyon sonrası glomerüllerin yeni girdikleri kültür ortamına verdikleri yanıt olarak ortaya çıkmıştır. Silastazol ve Glikoz gruplarında *Blank* grubuna göre anlamlı derecede daha az LC3-I pozitifliği görülmesi silastazol ve glikozun otofajik aktiviteyi artırdığını göstermiştir. Glikozun glomerüler hücrelerde otofajiyi artırdığı yönündeki bulguları [91, 93] ex-vivo kültür ortamında gösteren bu çalışmamız aynı zamanda silastazolün glomerüler hücrelerde otofajiyi artırdığını da ortaya koymuştur. Otofajik akışın en fazla çoğaldığı grup SG grubu olmuştur. Glikoz grubundaki otofaji artışı glomerül korunmasını sağlayamazken silastazolle desteklenen glomerüllerde endotel hücreleri ve podositler açısından korunma olduğu bulunmuştur.

Glomerüler hücrelerde meydana gelen hücresel ve morfolojik değişikliklerin temelinde hücrelerin birbirleriyle etkileşimi bulunmaktadır. Bu faktörlerden kapiller stabilitesini ve değişimini düzenleyen Anjiyopoetin 1 (Angpt1) ve Anjiyopoetin 2 (Angpt2) faktörlerinin podositlerden salgılandığı ve kritik bir dengeyle glomerüler kapillerleri etkilediği bilinmektedir [35]. Angpt1 hem gelişim hem de hasar durumlarında kapiller ağ için önemliken [166] onun antagonisti olan Angpt2'nin hem DN'de fazla eksprese olduğu hem de podositlerdeki fazla ekspresyonunun glomerüllerde mikrovasküler lezyonlara sebep olduğu gösterilmiştir [167, 168]. Bu iki etkileşim faktöründen Angpt1 fazla miktarda, Angpt2 az miktarda olduğunda kapiller stabilitesi sağlanırken Angpt1'in azalması Angpt2'nin artması endotel disfonksiyonuna ve kapiller dengesizliğine neden olmaktadır [169]. Bu iki faktörün glomerüllerin içinde kültüre edildiği medyunda miktarları araştırıldığında Glikoz grubunda Kontrol grubuna kıyasla Angpt1'de belirgin azalma Angpt2'de belirgin artma görülmesi kapillerlerin stabilitesinde

azalma olduğunu göstermektedir. Silastazol verildiği durumda ise bu faktörlerden Angpt1 anlamlı olarak azalırken Angpt2’de anlamlı değişiklik olmaması silastazolün tek başına kapiller dengesizliğine neden olmadığını göstermiştir. SG grubunda Glikoz grubuna göre Angpt1 miktarı belirgin farklılık göstermezken Angpt2 miktarı belirgin olarak azalmıştır. Bu sonuç tek başına silastazolün endotel disfonksiyonuna sebep olan Angpt2 faktöründe azalma sağladığını ortaya koymuştur. Klorokin etken maddesi ise gruplar arasında anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. VEGF-A faktörü ise yine podositler tarafından salgılanmaktadır ve glomerüllerde endotel morfolojisini ve fonksiyonunu koruduğu bilinmektedir [96]. Silastazolün VEGF-A üzerindeki etkisi daha önce bir periferik iskemi modelinde ve endotel hücre kültüründe çalışılmış ve silastazolün VEGF-A’yı artırdığı gösterilmiştir [113, 157]. Fakat sıçan böbreği üzerinde yapılan bir başka çalışma bu bulgularla çelişecek şekilde silastazolün renal kortekste VEGF-A miktarını azalttığını öne sürmüştür [119]. Bizim bu çalışmamızda ise silastazol hem tek başına verildiğinde hem de glikozla beraber verildiğinde glomerüllerde VEGF-A miktarını artırmıştır. Glomerül için önemli bir diğer faktör yine podositler tarafından salgılanan SDF-1’dir. Podositlerden salgılanan bu faktörün podosit öncüllerinin aktifliğini baskıladığı ve glomerüler kapillerlerin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir [170, 171]. Podositlerde hasar meydana geldiği durumda bu faktörün seviyesinde düşme gerçekleşmekte ve paryetal hücreler çoğalma ve farklılaşma yönünde uyarılmaktadır. Kapsülden ayrılmış olarak kültüre ettiğimiz glomerüllerden salgılanan SDF-1 seviyelerine bakıldığında Glikoz grubu *Blank* gruba göre anlamlı olarak artmamışken SG grubunda anlamlı artış olmuştur. Bu sonuca göre silastazol glomerüler hasar durumunda kapiller yapıyı etkileyecek ve yeniden düzenleyecek SDF-1 faktörünün podositlerden gerçekleşen salınımını uyarmıştır. Tüm anjiyogenik faktörler ile ilgili bulgularımız değerlendirildiğinde, kapiller stabilitesi glikoz grubunda azalmışken silastazol uygulanan gruplarda kısmen korunmuş olarak bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen bu tez çalışması, yüksek glikoza maruz kalan glomerüllerde oluşan hasar bulgularının endotel hücrelerini indükleyen silastazol etken maddesiyle hafifletilebildiğini göstermiştir. Silastazol uygulaması mezengiyal matriks artışı, glomerüler bazal membran kalınlaşması ve podosit kaybı bulgularını diyabetik nefropatinin ex-vivo olarak modellendiği glomerüllerde azaltmıştır. Glomerül genelinde epitelyal mezenkimal dönüşüm belirteci olan vimentin bulgusu yine silastazol yardımıyla hafiflemiş olarak bulunmuştur. Endotel hücrelerini yenileyici ve koruyucu etkisi olduğu bilinen silastazol ajanı glomerüllerdeki mevcut kapillerleri CD31 belirteciyle tespit edildiği şekliyle korurken aynı zamanda nefrin ve sinaptopodin işaretlemesiyle gösterildiği haliyle podositlerin de korunmasını sağlamıştır. Böylece daha fazla glomerüler filtrasyon birimi morfolojik olarak bozulmaktan korunmuştur. Bu korunmada otofajinin önemli bir katkısı olduğu görülmüş ve glomerülde daha az sayıda apoptotik hücre izlendiği tespit edilmiştir. Ayrıca glomerül içerisindeki bu korunmada etkileşim faktörlerinden VEGF-A, SDF-1, Anjiyopoetin 1 ve 2 faktörlerinin etkin olabileceğini göstermiştir. Glomerüler endotel hücrelerinin glomerül korunmasındaki bu etkinliği anjiyogenez yolları ayrıntılı incelenerek daha net olarak ortaya konulabilecektir. Ayrıca bu süreçteki otofaji etkinliğini daha açık şekilde gösterebilmek için otofaji yolağının daha fazla parametreyle incelenmesi faydalı olacaktır. Glomerüllerin daha uzun süreyle ve aktif dolaşım ile kültürlenebileceği seçenekler bu konuda daha belirgin sonuçlar ortaya koyabilmek imkanına sahiptir. Yine endotel hücrelerinin podositlerin podosit projenitörlerince yenilenmesi sürecinde nasıl bir rol oynadığını araştırmak diyabetik nefropati başta olmak üzere tüm glomerülopatiler için faydalı sonuçlar verecektir.

KAYNAKLAR

1. El Nahas, A. M., Bello, A. K., Meguid El Nahas, A., & Bello, A. K. (2005). Chronic kidney disease: The global challenge. *Lancet*, 365(9456), 331–340. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17789-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17789-7)
2. Evans, P. D., & Taal, M. W. (2011). Epidemiology and causes of chronic kidney disease. *Medicine*, 39(7), 402–406. <https://doi.org/10.1016/J.MPMED.2011.04.007>
3. Tryggvason, K., & Wartiovaara, J. (2005). How does the kidney filter plasma? *Physiology*. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2004>
4. Haraldsson, B., Nystrom, J., & Deen, W. M. (2008). Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev*, 88(2), 451–487. <https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2006>
5. Pollock, C. A., & Poronnik, P. (2007). Albumin transport and processing by the proximal tubule: physiology and pathophysiology. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 16(4), 359–364. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3281eb9059>
6. Gnudi, L., Gentile, G., & Ruggerenti, P. (2015). The patient with diabetes mellitus. *Case Studies in Clinical Psychological Science: Bridging the Gap from Science to Practice*, (August), 1–7. https://doi.org/10.1093/MED/9780199592548.003.0149_UPDATE_001
7. Gajjala, P. R., Sanati, M., & Jankowski, J. (2015). Cellular and molecular mechanisms of chronic kidney disease with diabetes mellitus and cardiovascular diseases as its comorbidities. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00340>
8. Maestroni, S., & Zerbini, G. (2018). Glomerular endothelial cells versus podocytes as the cellular target in diabetic nephropathy. *Acta Diabetol*, 55(11), 1105–1111. <https://doi.org/10.1007/s00592-018-1211-2>
9. Tung, C. W., Hsu, Y. C., Shih, Y. H., Chang, P. J., & Lin, C. L. (2018). Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy. *Nephrology*. <https://doi.org/10.1111/nep.13451>
10. Dai, H., Liu, Q., & Liu, B. (2017). Research Progress on Mechanism of Podocyte Depletion in Diabetic Nephropathy. *Journal of Diabetes Research*. <https://doi.org/10.1155/2017/2615286>
11. Vogelmann, S. U., Nelson, W. J., Myers, B. D., & Lemley, K. V. (2003). Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 285(1), F40–F48. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00404.2002>
12. Tan, H., Yi, H., Zhao, W., Ma, J. X., Zhang, Y., & Zhou, X. (2016). Intraglomerular crosstalk elaborately regulates podocyte injury and repair in diabetic patients: insights from a 3D multiscale modeling study. *Oncotarget*, 7(45), 73130–73146.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12233>

13. Lennon, R., & Hosawi, S. (2016). Glomerular cell crosstalk. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 25(3), 187–193. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000221>
14. Ronconi, E., Sagrinati, C., Angelotti, M. L., Lazzeri, E., Mazzinghi, B., Ballerini, L., ... Romagnani, P. (2009). Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol*, 20(2), 322–332. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070709>
15. Shankland, S. J., Pippin, J. W., & Duffield, J. S. (2014). Progenitor cells and podocyte regeneration. *Semin Nephrol*, 34(4), 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2014.06.008>
16. Dressler, G. R. (2006). The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 509–529. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104340>
17. Schell, C., Wanner, N., & Huber, T. B. (2014). Glomerular development - Shaping the multi-cellular filtration unit. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.016>
18. Ichimura, K., Kakuta, S., Kawasaki, Y., Miyaki, T., Nonami, T., Miyazaki, N., ... Sakai, T. (2017). Morphological process of podocyte development revealed by block-face scanning electron microscopy. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.187815>
19. Segarra, M., Aburto, M. R., Cop, F., Llaó-Cid, C., Härtl, R., Damm, M., ... Acker-Palmer, A. (2018). Endothelial Dab1 signaling orchestrates neuro-glia-vessel communication in the central nervous system. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aao2861>
20. Peguera, B., Segarra, M., & Acker-Palmer, A. (2021). Neurovascular crosstalk coordinates the central nervous system development. *Current opinion in neurobiology*, 69, 202–213. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2021.04.005>
21. Li, X., Zhou, L., Zhang, X., Jin, Y., Zhao, B., Zhang, D., ... Jia, J. M. (2022). Proteins secreted by brain arteriolar smooth muscle cells are instructive for neural development. *Molecular brain*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S13041-022-00983-Y>
22. Andreone, B. J., Lacoste, B., & Gu, C. (2015). Neuronal and Vascular Interactions. *Annual Review of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033835>
23. Tam, S. J., & Watts, R. J. (2010). Connecting Vascular and Nervous System Development: Angiogenesis and the Blood-Brain Barrier. *Annual Review of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-152829>
24. Seckin, I., Uzunalan, M., Pekpak, M., Kokturk, S., Sonmez, H., Ozturk, Z., ... Yaprak, E. (2012). Experimentally induced puromycin aminonucleoside nephrosis (PAN) in rats: evaluation of angiogenic protein platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) expression in glomeruli. *J Biomed Sci*, 19, 24. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-24>
25. Saygi, H. I., Gungor, Z. B., Kalay, F., & Seckin, I. (2018). In glomerular cells of puromycin aminonucleoside nephrosis rats both phosphorylated and total STAT3

- levels increased during proteinuria. *Acta Histochem.*
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.07.005>
26. Yamamoto, T. (2009). Isolation and Enrichment of Glomeruli Using Sieving Techniques. *Renal and Urinary Proteomics: Methods and Protocols*, 1–7.
<https://doi.org/10.1002/9783527628612.CH1>
 27. Samuel, T., Hoy, W. E., Douglas-Denton, R., Hughson, M. D., & Bertram, J. F. (2007). Applicability of the glomerular size distribution coefficient in assessing human glomerular volume: the Weibel and Gomez method revisited. *Journal of Anatomy*, 210(5), 578. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7580.2007.00715.X>
 28. Dressler, G. R. (2006). The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 509–529. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104340>
 29. Costantini, F., & Kopan, R. (2010). Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev Cell*, 18(5), 698–712. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.04.008>
 30. Tufro, A., Norwood, V. F., Carey, R. M., & Gomez, R. A. (1999). Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. *J Am Soc Nephrol*, 10(10), 2125–2134. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10505689>
 31. Kitamoto, Y., Tokunaga, H., & Tomita, K. (1997). Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. *J Clin Invest*, 99(10), 2351–2357. <https://doi.org/10.1172/JCI119416>
 32. Lindahl, P., Hellström, M., Kalén, M., Karlsson, L., Pekny, M., Pekna, M., ... Betsholtz, C. (1998). Paracrine PDGF-B/PDGF-R β signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development*, 125(17), 3313–3322.
<https://doi.org/10.1242/DEV.125.17.3313>
 33. Ruotsalainen, V., Patrakka, J., Tissari, P., Reponen, P., Hess, M., Kestila, M., ... Jalanko, H. (2000). Role of Nephricin in Cell Junction Formation in Human Nephrogenesis. *The American Journal of Pathology*, 157(6), 1905–1916.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64829-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64829-8)
 34. Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrara, N., ... Quaggin, S. E. (2003). Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest*, 111(5), 707–716.
<https://doi.org/10.1172/JCI17423>
 35. Satchell, S. C., Harper, S. J., Tooke, J. E., Kerjaschki, D., Saleem, M. A., & Mathieson, P. W. (2002). Human podocytes express angiopoietin 1, a potential regulator of glomerular vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol*, 13(2), 544–550.
<https://doi.org/10.1681/ASN.V132544>
 36. Kolatsi-Joannou, M., Li, X. Z., Suda, T., Yuan, H. T., Woolf, A. S., Tsuda, T., ... Chu, M. L. (2001). Expression and potential role of angiopoietins and Tie-2 in early development of the mouse metanephros. *Dev Dyn*, 222(1), 120–126.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.1170>
 37. Anders, H. J., Kitching, A. R., Leung, N., & Romagnani, P. (2023). Glomerulonephritis: immunopathogenesis and immunotherapy. *Nature Reviews*

- Immunology* 2023, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00816-y>
38. Satchell, S. C., & Braet, F. (2009). Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol Renal Physiol*, 296(5), F947–56. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90601.2008>
 39. Scott, R. P., & Quaggin, S. E. (2015). The cell biology of renal filtration. *Journal of Cell Biology*, 209(2), 199–210. <https://doi.org/10.1083/JCB.201410017>
 40. Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., van Zandvoort, M. A., & oude Egbrink, M. G. (2007). The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch*, 454(3), 345–359. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8>
 41. Hjalmarsson, C., Johansson, B. R., & Haraldsson, B. (2004). Electron microscopic evaluation of the endothelial surface layer of glomerular capillaries. *Microvascular Research*, 67(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2003.10.001>
 42. Tarbell, J. M., & Ebong, E. E. (2008). The endothelial glycocalyx: A mechano-sensor and -transducer. *Science Signaling*. <https://doi.org/10.1126/scisignal.140pt8>
 43. Feliers, D., Chen, X., Akis, N., Choudhury, G. G., Madaio, M., & Kasinath, B. S. (2005). VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells. *Kidney International*. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00575.x>
 44. Dhaun, N., Webb, D. J., & Kluth, D. C. (2012). Endothelin-1 and the kidney - Beyond BP. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02070.x>
 45. Satchell, S. (2013). The role of the glomerular endothelium in albumin handling. *Nat Rev Nephrol*, 9(12), 717–725. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.197>
 46. Byron, A., Randles, M. J., Humphries, J. D., Mironov, A., Hamidi, H., Harris, S., ... Lennon, R. (2014). Glomerular cell cross-talk influences composition and assembly of extracellular matrix. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(5), 953–966. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013070795/-/DCSUPPLEMENTAL>
 47. Miner, J. H. (2012). The glomerular basement membrane. *Exp Cell Res*, 318(9), 973–978. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.031>
 48. Abrahamson, D. R. (2009). Development of kidney glomerular endothelial cells and their role in basement membrane assembly. *Organogenesis*. <https://doi.org/10.4161/org.7577>
 49. Farquhar, M. G. (2006). The glomerular basement membrane: Not gone, just forgotten. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI29488>
 50. Pavenstädt, H., Kriz, W., & Kretzler, M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2002>
 51. Mundel, P., & Kriz, W. (1995). Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl)*, 192(5), 385–397. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8546330>
 52. Greka, A., & Mundel, P. (2012). Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol*, 74, 299–323. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153238>

53. Grahammer, F., Schell, C., & Huber, T. B. (2013). The podocyte slit diaphragm--from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol*, 9(10), 587–598. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.169>
54. Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K., & Mundel, P. (2007). Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol*, 17(9), 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.06.006>
55. Benzing, T. (2005). The slit diaphragm : A signaling platform to regulate podocyte function. *Japanese Journal of Nephrology*. <https://doi.org/10.14842/jpnjnephrol1959.47.230>
56. Grahammer, F., Schell, C., & Huber, T. B. (2013). Molecular understanding of the slit diaphragm. *Pediatr Nephrol*, 28(10), 1957–1962. <https://doi.org/10.1007/s00467-012-2375-6>
57. Rossing, P., Persson, F., & Frimodt-Møller, M. (2018). Prognosis and treatment of diabetic nephropathy: Recent advances and perspectives. *Nephrologie et Therapeutique*. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2018.02.007>
58. Yamanouchi, M., Furuichi, K., Hoshino, J., Ubara, Y., & Wada, T. (2020). Nonproteinuric diabetic kidney disease. *Clinical and Experimental Nephrology*. <https://doi.org/10.1007/s10157-020-01881-0>
59. Reidy, K., Kang, H. M., Hostetter, T., & Susztak, K. (2014). Molecular mechanisms of Diabetic kidney disease. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI72271>
60. Lorenzi, M., Cagliero, E., & Toledo, S. (1985). Glucose toxicity for human endothelial cells in culture. Delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. *Diabetes*, 34(7), 621–627. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3924693>
61. Ochodnický, P., Henning, R. H., Van Dokkum, R. P. E., & De Zeeuw, D. (2006). Microalbuminuria and endothelial dysfunction: Emerging targets for primary prevention of end-organ damage. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1097/00005344-200606001-00009>
62. Stehouwer, C. D. A. (2004). Endothelial dysfunction in diabetic nephropathy: State of the art and potential significance for non-diabetic renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh015>
63. Marechal, X., Favory, R., Joulin, O., Montaigne, D., Hassoun, S., Decoster, B., ... Neviere, R. (2008). Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock*, 29(5), 572–576. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318157e926>
64. Li, T., Shen, K., Li, J., Leung, S. W. S., Zhu, T., & Shi, Y. (2021). Glomerular Endothelial Cells Are the Coordinator in the Development of Diabetic Nephropathy. *Frontiers in Medicine*, 8, 886. <https://doi.org/10.3389/FMED.2021.655639/BIBTEX>
65. Fu, J., Lee, K., Chuang, P. Y., Liu, Z. H., & He, J. C. (2015). Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease. *American Journal of Physiology -*

- Renal Physiology*, 308(4), F287–F297. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00533.2014>
66. Salmon, A. H., & Satchell, S. C. (2012). Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. *The Journal of pathology*, 226(4), 562–574. <https://doi.org/10.1002/PATH.3964>
 67. Satchell, S. C., & Tooke, J. E. (2008). What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia*, 51(5), 714–725. <https://doi.org/10.1007/S00125-008-0961-8>
 68. Qi, H., Casalena, G., Shi, S., Yu, L., Ebefors, K., Sun, Y., ... Daehn, I. (2017). Glomerular endothelial mitochondrial dysfunction is essential and characteristic of diabetic kidney disease susceptibility. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db16-0695>
 69. Kanetsuna, Y., Takahashi, K., Nagata, M., Gannon, M. A., Breyer, M. D., Harris, R. C., & Takahashi, T. (2007). Deficiency of endothelial nitric-oxide synthase confers susceptibility to diabetic nephropathy in nephropathy-resistant inbred mice. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060481>
 70. Nakayama, T., Sato, W., Kosugi, T., Zhang, L., Campbell-Thompson, M., Yoshimura, A., ... Nakagawa, T. (2009). Endothelial injury due to eNOS deficiency accelerates the progression of chronic renal disease in the mouse. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90450.2008>
 71. Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
 72. Shi, Y., Vanhoutte, P. M., Yi Shi, C., & Research Centre, B. (2017). Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *Journal of Diabetes*, 9(5), 434–449. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12521>
 73. Peng, H., Li, Y., Wang, C., Zhang, J., Chen, Y., Chen, W., ... Lou, T. (2016). ROCK1 Induces Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Glomeruli to Aggravate Albuminuria in Diabetic Nephropathy. *Scientific reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP20304>
 74. Kruegel, J., Rubel, D., & Gross, O. (2013). Alport syndrome--insights from basic and clinical research. *Nat Rev Nephrol*, 9(3), 170–178. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.259>
 75. Zenker, M., Aigner, T., Wendler, O., Tralau, T., Müntefering, H., Fenski, R., ... Reis, A. (2004). Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Human molecular genetics*, 13(21), 2625–2632. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDH284>
 76. Herman-Edelstein, M., & Doi, S. Q. (2016). Pathophysiology of diabetic nephropathy. In *Proteinuria: Basic Mechanisms, Pathophysiology and Clinical Relevance*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43359-2_4
 77. Marshall, C. B. (2016). Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: Adaptive or pathogenic? *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 311(5), F831–F843. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00313.2016>
 78. Bai, Y., Wang, L., Li, Y., Liu, S., Li, J., Wang, H., & Huang, H. (2006). High ambient

- glucose levels modulates the production of MMP-9 and $\alpha 5(\text{IV})$ collagen by cultured podocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1159/000091464>
79. Iglesias-De la Cruz, M. C., Ziyadeh, F. N., Isono, M., Kouahou, M., Han, D. C., Kalluri, R., ... Chen, S. (2002). Effects of high glucose and TGF- $\beta 1$ on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney International*. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00528.x>
 80. Anil Kumar, P., Welsh, G. I., Saleem, M. A., & Menon, R. K. (2014). Molecular and cellular events mediating glomerular podocyte dysfunction and depletion in diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5, 151. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00151>
 81. Kriz, W., & LeHir, M. (2005). Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases—Insights from animal models. *Kidney International*, 67(2), 404–419. <https://doi.org/10.1111/J.1523-1755.2005.67097.X>
 82. Yamaguchi, Y., Iwano, M., Suzuki, D., Nakatani, K., Kimura, K., Harada, K., ... Saito, Y. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transition as a Potential Explanation for Podocyte Depletion in Diabetic Nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 54(4), 653–664. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.05.009>
 83. Liu, Y. (2004). Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000106015.29070.e7>
 84. Herbach, N., Schairer, I., Blutke, A., Kautz, S., Siebert, A., Göke, B., ... Wanke, R. (2009). Diabetic kidney lesions of GIPRdn transgenic mice: Podocyte hypertrophy and thickening of the GBM precede glomerular hypertrophy and glomerulosclerosis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90665.2008>
 85. Lin, J. S., & Susztak, K. (2016). Podocytes: the Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? *Current Diabetes Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0735-5>
 86. Nagata, M. (2016). Podocyte injury and its consequences. *Kidney International*, 89(6), 1221–1230. <https://doi.org/10.1016/J.KINT.2016.01.012>
 87. Fang, L., Zhou, Y., Cao, H., Wen, P., Jiang, L., He, W., ... Yang, J. (2013). Autophagy Attenuates Diabetic Glomerular Damage through Protection of Hyperglycemia-Induced Podocyte Injury. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060546>
 88. Hartleben, B., Gödel, M., Meyer-Schwesinger, C., Liu, S., Ulrich, T., Köbler, S., ... Huber, T. B. (2010). Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI39492>
 89. Zhang, L., Livingston, M. J., Chen, J. K., & Dong, Z. (2014). Autophagy in podocytes. In *Podocytopathy*. <https://doi.org/10.1159/000360015>
 90. Lin, T.-A., Wu, V. C.-C., & Wang, C.-Y. (2019). Autophagy in Chronic Kidney Diseases. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells8010061>
 91. Yang, D., Livingston, M. J., Liu, Z., Dong, G., Zhang, M., Chen, J. K., & Dong, Z.

- (2018). Autophagy in diabetic kidney disease: regulation, pathological role and therapeutic potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2639-1>
92. Lenoir, O., Jasiek, M., Hénique, C., Guyonnet, L., Hartleben, B., Bork, T., ... Tharaux, P. L. (2015). Endothelial cell and podocyte autophagy synergistically protect from diabetes-induced glomerulosclerosis. *Autophagy*.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1049799>
 93. Tagawa, A., Yasuda, M., Kume, S., Yamahara, K., Nakazawa, J., Chin-Kanasaki, M., ... Uzu, T. (2016). Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db15-0473>
 94. Dimke, H., Maezawa, Y., & Quaggin, S. E. (2015). Crosstalk in glomerular injury and repair. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 24(3), 231–238.
<https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000117>
 95. Sivaskandarajah, G. A., Jeansson, M., Maezawa, Y., Eremina, V., Baelde, H. J., & Quaggin, S. E. (2012). Vegfa protects the glomerular microvasculature in diabetes. *Diabetes*, 61(11), 2958–2966. <https://doi.org/10.2337/db11-1655>
 96. Siddiqi, F. S., & Advani, A. (2013). Endothelial-podocyte crosstalk: the missing link between endothelial dysfunction and albuminuria in diabetes. *Diabetes*, 62(11), 3647–3655. <https://doi.org/10.2337/db13-0795>
 97. Ollero, M., & Sahali, D. (2015). Inhibition of the VEGF signalling pathway and glomerular disorders. *Nephrology Dialysis Transplantation*.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfu368>
 98. Sung, S. H., Ziyadeh, F. N., Wang, A., Pyagay, P. E., Kanwar, Y. S., & Chen, S. (2006). Blockade of vascular endothelial growth factor signaling ameliorates diabetic albuminuria in mice. *Journal of the American Society of Nephrology*.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2006010064>
 99. Takabatake, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Matsusaka, T., Kurihara, H., Koni, P. A., ... Isaka, Y. (2009). The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis is essential for the development of renal vasculature. *J Am Soc Nephrol*, 20(8), 1714–1723.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2008060640>
 100. Bobkova, I., Chebotareva, N., Schukina, A., Kamyshova, E., & Bobrova, L. (2018). New Insights into the Molecular Mechanisms of Podocytes Injury in Diabetes. *Journal of Clinical & Experimental Nephrology*. <https://doi.org/10.21767/2472-5056.100068>
 101. Massa, F., & Schedl, A. (2018). Awakening the Bowman: inhibition of CXCL12 signaling activates parietal epithelial cells. *Kidney International*.
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.09.011>
 102. Lim, H. S., Lip, G. Y. H., & Blann, A. D. (2005). Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in diabetes mellitus: Relationship to VEGF, glycaemic control, endothelial damage/dysfunction and atherosclerosis. *Atherosclerosis*.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.004>
 103. Satchell, S. C., Harper, S. J., Tooke, J. E., Kerjaschki, D., Saleem, M. A., & Mathieson, P. W. (2002). Human podocytes express angiopoietin 1, a potential regulator of

- glomerular vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol*, 13(2), 544–550. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11805186>
104. Yamamoto, Y., Maeshima, Y., Kitayama, H., Kitamura, S., Takazawa, Y., Sugiyama, H., ... Makino, H. (2004). Tumstatin peptide, an inhibitor of angiogenesis, prevents glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 53(7), 1831–1840. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.53.7.1831>
 105. Gerhard-Herman, M. D., Gornik, H. L., Barrett, C., Barshes, N. R., Corriere, M. A., Drachman, D. E., ... Wijeyesundera, D. N. (2017). 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients with Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Executive Summary. *Vascular medicine (London, England)*, 22(3), NP1–NP43. <https://doi.org/10.1177/1358863X17701592>
 106. Kambayashi, J., Liu, Y. G., Sun, B., Shakur, Y., Yoshitake, M., & Czerwiec, F. (2003). Cilostazol as a unique antithrombotic agent. *Curr Pharm Des.* <https://doi.org/10.2174/1381612033453910>
 107. Yamamoto, S., Kurokawa, R., & Kim, P. (2014). Cilostazol, a selective Type III phosphodiesterase inhibitor: Prevention of cervical myelopathy in a rat chronic compression model. Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery: Spine.* <https://doi.org/10.3171/2013.9.SPINE121136>
 108. Kimura, Y., Tani, T., Kanbe, T., & Watanabe, K. (1985). Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittel-Forschung.*
 109. de Donato, G., Setacci, F., Mele, M., Giannace, G., Galzerano, G., & Setacci, C. (2017). Restenosis after Coronary and Peripheral Intervention: Efficacy and Clinical Impact of Cilostazol. *Annals of Vascular Surgery*, 41, 300–307. <https://doi.org/10.1016/J.AVSG.2016.08.050>
 110. Morishita, R., Higaki, J., Hayashi, S. I., Yo, Y., Aoki, M., Nakamura, S., ... Ogihara, T. (1997). Role of hepatocyte growth factor in endothelial regulation: Prevention of high D-glucose-induced endothelial cell death by prostaglandins and phosphodiesterase type 3 inhibitor. *Diabetologia.* <https://doi.org/10.1007/s001250050787>
 111. Shin, H. K., Kim, Y. K., Kim, K. Y., Lee, J. H., & Hong, K. W. (2004). Remnant Lipoprotein Particles Induce Apoptosis in Endothelial Cells by NAD(P)H Oxidase-Mediated Production of Superoxide and Cytokines via Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Activation: Prevention by Cilostazol. *Circulation.* <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000117403.64398.53>
 112. Hashimoto, A., Miyakoda, G., Hirose, Y., & Mori, T. (2006). Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Atherosclerosis.* <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.01.022>
 113. Biscetti, F., Pecorini, G., Straface, G., Arena, V., Stigliano, E., Rutella, S., ... Flex, A. (2013). Cilostazol promotes angiogenesis after peripheral ischemia through a VEGF-dependent mechanism. *International Journal of Cardiology.* <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.03.103>
 114. Lee, W. C., Chen, H. C., Wang, C. Y., Lin, P. Y., Ou, T. T., Chen, C. C., ... Lee, H. J. (2010). Cilostazol ameliorates nephropathy in type 1 diabetic rats involving

- improvement in oxidative stress and regulation of TGF- β and NF- κ B. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1271/bbb.90938>
115. Matsumoto, M. (2005). Cilostazol in secondary prevention of stroke: Impact of the Cilostazol Stroke Prevention Study. *Atherosclerosis Supplements*. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosissup.2005.09.003>
 116. Rosales, R. L., Delgado-Delos Santos, M. M. S., & Mercado-Asis, L. B. (2011). Cilostazol: A pilot study on safety and clinical efficacy in neuropathies of diabetes mellitus type 2 (ASCEND). *Angiology*. <https://doi.org/10.1177/0003319711410594>
 117. Chian, C. W., Lee, Y. S., Lee, Y. J., Chen, Y. H., Wang, C. P., Lee, W. C., & Lee, H. J. (2020). Cilostazol ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting high-glucose-induced apoptosis. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2020.24.5.403>
 118. Koike, N., Takamura, T., & Kaneko, S. (2007). Induction of reactive oxygen species from isolated rat glomeruli by protein kinase C activation and TNF- α stimulation, and effects of a phosphodiesterase inhibitor. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.001>
 119. Wang, F., Li, M., Cheng, L., Zhang, T., Hu, J., Cao, M., ... Zhang, X. (2008). Intervention with cilostazol attenuates renal inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.09.027>
 120. Wang, X., Yan, L., Chen, W., Xu, L., & Zhang, X. (2009). The renal protective effects of cilostazol on suppressing pathogenic thrombospondin-1 and transforming growth factor- β expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of International Medical Research*. <https://doi.org/10.1177/147323000903700117>
 121. Lee, H. R., Shin, H. K., Park, S. Y., Kim, H. Y., Bae, S. S., Lee, W. S., ... Kim, C. D. (2015). Cilostazol upregulates autophagy via SIRT1 activation: Reducing amyloid- β peptide and APP-CTF β levels in neuronal cells. *PLoS ONE*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134486>
 122. Kim, H. N., Seo, B. R., Kim, H., & Koh, J. Y. (2020). Cilostazol restores autophagy flux in bafilomycin A1-treated, cultured cortical astrocytes through lysosomal reacidification: roles of PKA, zinc and metallothionein 3. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66292-3>
 123. Rush, B. M., Small, S. A., Stolz, D. B., & Tan, R. J. (2018). An Efficient Sieving Method to Isolate Intact Glomeruli from Adult Rat Kidney. *Journal of visualized experiments : JoVE*. <https://doi.org/10.3791/58162>
 124. Katsoulieiris, E. N., Drossopoulou, G. I., Kotsopoulou, E. S., Vlahakos, D. V., Lianos, E. A., & Tsilibary, E. C. (2016). High glucose impairs insulin signaling in the glomerulus: An in vitro and ex vivo approach. *PLoS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158873>
 125. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods 2012 9:7*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
 126. Zaqout, S., Becker, L. L., & Kaindl, A. M. (2020). Immunofluorescence Staining of

- Paraffin Sections Step by Step. *Frontiers in Neuroanatomy*, 14, 83.
<https://doi.org/10.3389/FNANA.2020.582218/BIBTEX>
127. Ozkan, S., Isildar, B., Ercin, M., Gezgin-Oktayoglu, S., Konukoglu, D., Neşetoğlu, N., ... Koyuturk, M. (2022). Therapeutic potential of conditioned medium obtained from deferoxamine preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cells on diabetic nephropathy model. *Stem cell research & therapy*, 13(1).
<https://doi.org/10.1186/S13287-022-03121-6>
 128. Lassén, E., & Daehn, I. S. (2020). Molecular mechanisms in early diabetic kidney disease: Glomerular endothelial cell dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21249456>
 129. Krakower, C., & Greenspon, S. (1954). Factors leading to variation in concentration of nephrotoxic antigen(s) of glomerular basement membrane. *A.M.A. archives of pathology*.
 130. Takemoto, M., Asker, N., Gerhardt, H., Lundkvist, A., Johansson, B. R., Saito, Y., & Betsholtz, C. (2002). A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *The American journal of pathology*, 161(3), 799–805.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64239-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64239-3)
 131. Ishikawa, Y., & Kitamura, M. (1998). Spontaneous apoptosis of podocytes in explanted glomeruli. Technical note. *Kidney international*, 54(6), 2008–2013.
<https://doi.org/10.1046/J.1523-1755.1998.00206.X>
 132. Fu, J., Lee, K., Chuang, P. Y., Liu, Z. H., & He, J. C. (2015). Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 308(4), F287–F297. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00533.2014>
 133. Erekat, N. S. (2022). Programmed Cell Death in Diabetic Nephropathy: A Review of Apoptosis, Autophagy, and Necroptosis. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 28, e937766-1.
<https://doi.org/10.12659/MSM.937766>
 134. Tharaux, P. L., & Huber, T. B. (2012). How Many Ways Can a Podocyte Die? *Seminars in Nephrology*, 32(4), 394–404.
<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.06.011>
 135. Casalena, G. A., Yu, L., Gil, R., Rodriguez, S., Sosa, S., Janssen, W., ... Daehn, I. S. (2020). The diabetic microenvironment causes mitochondrial oxidative stress in glomerular endothelial cells and pathological crosstalk with podocytes. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12964-020-00605-X/FIGURES/6>
 136. Gil, C. L., Hooker, E., & Larrivé, B. (2021). Diabetic Kidney Disease, Endothelial Damage, and Podocyte-Endothelial Crosstalk. *Kidney Medicine*, 3(1), 105–115.
<https://doi.org/10.1016/J.XKME.2020.10.005>
 137. Lee, Y. J., Shu, M. S., Kim, J. Y., Kim, Y. H., Sim, K. H., Sung, W. J., & Eun, J. R. (2019). Cilostazol protects hepatocytes against alcohol-induced apoptosis via activation of AMPK pathway. *PloS one*, 14(1).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0211415>

138. Sim, K. H., Shu, M. S., Kim, S., Kim, J. Y., Choi, B. H., & Lee, Y. J. (2021). Cilostazol Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells by Activating AMPK. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 26(5), 776–785. <https://doi.org/10.1007/S12257-021-0002-8/METRICS>
139. May, C. J., Saleem, M., & Welsh, G. I. (2014). Podocyte dedifferentiation: A specialized process for a specialized cell. *Frontiers in Endocrinology*, 5(OCT), 148. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2014.00148/ABSTRACT>
140. Cortes, P., Mendez, M., Riser, B. L., Guerin, C. J., Rodriguez-Barbero, A., Hassett, C., & Yee, J. (2000). F-actin fiber distribution in glomerular cells: structural and functional implications. *Kidney international*, 58(6), 2452–2461. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1755.2000.00428.X>
141. Ying, Q., & Wu, G. (2017). Molecular mechanisms involved in podocyte EMT and concomitant diabetic kidney diseases: an update. *Renal Failure*, 39(1), 474. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2017.1313164>
142. Wang, E., Wang, H., & Chakrabarti, S. (2023). Endothelial-to-mesenchymal transition: An underappreciated mediator of diabetic complications. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 168. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1050540/BIBTEX>
143. Sato, S., Adachi, A., Sasaki, Y., & Dai, W. (2006). Autophagy by podocytes in renal biopsy specimens. *Journal of Nippon Medical School*, 73(2), 52–53. <https://doi.org/10.1272/JNMS.73.52>
144. Mundel, P., & Shankland, S. J. (2002). Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol*, 13(12), 3005–3015. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444221>
145. Verma, R., Venkatareddy, M., Kalinowski, A., Li, T., Kukla, J., Mollin, A., ... Garg, P. (2018). Nephrin is necessary for podocyte recovery following injury in an adult mature glomerulus. *PLOS ONE*, 13(6), e0198013. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0198013>
146. Susztak, K., Raff, A. C., Schiffer, M., & Böttinger, E. P. (2006). Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.01.06.db05-0894>
147. Wharram, B. L., Goyal, M., Wiggins, J. E., Sanden, S. K., Hussain, S., Filipiak, W. E., ... Wiggins, R. C. (2005). Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol*, 16(10), 2941–2952. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005010055>
148. Tossidou, I., Himmelseher, E., Teng, B., Haller, H., & Schiffer, M. (2014). SUMOylation determines turnover and localization of nephrin at the plasma membrane. *Kidney International*, 86(6), 1161–1173. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.198>
149. Spitz, D., Comas, M., Gerstner, L., Kayser, S., Helmstädter, M., Walz, G., & Hermle, T. (2022). mTOR-Dependent Autophagy Regulates Slit Diaphragm Density in Podocyte-like Drosophila Nephrocytes. *Cells*, 11(13), 2103.

<https://doi.org/10.3390/CELLS11132103/S1>

150. Bo, Y., Sun, Y., Qu, X., Zhang, X., Caruana, G., Bertram, J. F., & Li, J. (n.d.). Glomerular Endothelial Cell Injury and Damage Precedes That of Podocytes in Adriamycin-Induced Nephropathy. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055027>
151. Jiang, S., Luo, M., Bai, X., Nie, P., Zhu, Y., Cai, H., ... Luo, P. (2022). Cellular crosstalk of glomerular endothelial cells and podocytes in diabetic kidney disease. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 16(3), 313. <https://doi.org/10.1007/S12079-021-00664-W>
152. Wu, X., Gao, Y., Xu, L., Dang, W., Yan, H., Zou, D., ... Han, Z. (2017). Exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells trigger the epithelial-mesenchymal transition and dysfunction of podocytes. *Scientific reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-09907-6>
153. Jefferson, J. A., & Shankland, S. J. (2014). The Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Advances in chronic kidney disease*, 21(5), 408. <https://doi.org/10.1053/J.ACKD.2014.05.009>
154. Moeller, M. J., & Smeets, B. (2014). Role of parietal epithelial cells in kidney injury: the case of rapidly progressing glomerulonephritis and focal and segmental glomerulosclerosis. *Nephron Exp Nephrol*, 126(2), 97–100. <https://doi.org/10.1159/000360677>
155. Thomas, H. Y., & Ford Versypt, A. N. (2022). Pathophysiology of mesangial expansion in diabetic nephropathy: mesangial structure, glomerular biomechanics, and biochemical signaling and regulation. *Journal of Biological Engineering*, 16(1), 19. <https://doi.org/10.1186/S13036-022-00299-4>
156. Seckin, I., Uzunalan, M., Pekpak, M., Kokturk, S., Sonmez, H. A., Gungor, Z. B., ... Yaprak Sarac, E. (2017). The relationship between glomerular function and podocyte structure of pre-proteinuria and acute nephrosis in puromycin aminonucleoside-induced rat models: a comparative electron microscopic study. *Rom J Morphol Embryol*, 58(3), 823–830. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29250660>
157. Tseng, S. Y., Chao, T. H., Li, Y. H., Liu, P. Y., Lee, C. H., Cho, C. L., ... Chen, J. H. (2016). Cilostazol improves high glucose-induced impaired angiogenesis in human endothelial progenitor cells and vascular endothelial cells as well as enhances vasculoangiogenesis in hyperglycemic mice mediated by the adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway. *Journal of Vascular Surgery*, 63(4), 1051–1062.e3. <https://doi.org/10.1016/J.JVS.2014.10.103>
158. Salemkour, Y., & Lenoir, O. (2023). Endothelial Autophagy Dysregulation in Diabetes. *Cells* 2023, Vol. 12, Page 947, 12(6), 947. <https://doi.org/10.3390/CELLS12060947>
159. Mameli, E., Martello, A., & Caporali, A. (2022). Autophagy at the interface of endothelial cell homeostasis and vascular disease. *The FEBS Journal*, 289(11), 2976–2991. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15873>
160. Jiang, F. (2016). Autophagy in vascular endothelial cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 43(11), 1021–1028. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12649>

161. Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), 542–545. <https://doi.org/10.4161/auto.4600>
162. Zhang, J. (2015). Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists- Mechanisms and experimental approaches. *Redox Biology*, 4, 242–259. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2015.01.003>
163. Raudenska, M., Balvan, J., & Masarik, M. (2021). Crosstalk between autophagy inhibitors and endosome-related secretory pathways: a challenge for autophagy-based treatment of solid cancers. *Molecular Cancer*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-021-01423-6>
164. Ninfole, E., Pinto, C., Benedetti, A., Marzoni, M., & Maroni, L. (2021). Role of autophagy in cholangiocarcinoma: Pathophysiology and implications for therapy. *World journal of clinical cases*, 9(22), 6234–6243. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i22.6234>
165. Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K. J., ... Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14(8), 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>
166. Jeansson, M., Gawlik, A., Anderson, G., Li, C., Kerjaschki, D., Henkelman, M., & Quaggin, S. E. (2011). Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *The Journal of clinical investigation*, 121(6), 2278–2289. <https://doi.org/10.1172/JCI46322>
167. Davis, B., Cas, A. D., Long, D. A., White, K. E., Hayward, A., Ku, C. H., ... Gnudi, L. (2007). Podocyte-specific expression of angiopoietin-2 causes proteinuria and apoptosis of glomerular endothelia. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 18(8), 2320–2329. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006101093>
168. Sun, H., Zheng, J. M., Chen, S., Zeng, C. H., Liu, Z. H., & Li, L. S. (2007). Enhanced expression of ANGPTL2 in the microvascular lesions of diabetic glomerulopathy. *Nephron. Experimental nephrology*, 105(4). <https://doi.org/10.1159/000100493>
169. Ricciardi, C. A., & Gnudi, L. (2021). Vascular growth factors as potential new treatment in cardiorenal syndrome in diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*, 51(9). <https://doi.org/10.1111/ECI.13579>
170. Rizzo, P., Perico, N., Gagliardini, E., Novelli, R., Alison, M. R., Remuzzi, G., & Benigni, A. (2013). Nature and mediators of parietal epithelial cell activation in glomerulonephritides of human and rat. *Am J Pathol*, 183(6), 1769–1778. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.008>
171. Floege, J., Smeets, B., & Moeller, M. J. (2009). The SDF-1/CXCR4 axis is a novel driver of vascular development of the glomerulus. *J Am Soc Nephrol*, 20(8), 1659–1661. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009060621>

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SİLOSTAZOL'ÜN YÜKSEK GLİKOZ SEVİYESİNE MARUZ KALMIŞ
GLOMERÜLLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ve OTOFAJİNİN BU
SÜREÇTEKİ ROLÜNÜN EX-VİVO OLARAK İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 5	% 5	% 1	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK) Öğrenci Ödevi	% 2
3	www.jove.com İnternet Kaynağı	<% 1
4	Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants, 2014. Yayın	<% 1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
7	rcastoragev2.blob.core.windows.net İnternet Kaynağı	<% 1
8	katalog.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1