



**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**NEFROTİK SENDROM OLUŞTURULAN SIÇANLARDA RESVERATROL
VE METFORMİN TEDAVİLERİNİN BÖBREK DOKUSUNDAKİ ANTİ-
APOPTOTİK PROTEİNLERE ETKİLERİ**

Dr. Belçim HAZAR

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2022



**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**NEFROTİK SENDROM OLUŞTURULAN SIÇANLARDA RESVERATROL
VE METFORMİN TEDAVİLERİNİN BÖBREK DOKUSUNDAKİ ANTI-
APOPTOTİK PROTEİNLERE ETKİLERİ**

Dr. Belçim HAZAR

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Bilal YILDIZ

BURSA-2022

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
İNGİLİZCE ÖZET	v
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	
I.Nefrotik Sendrom.....	3
I.A. Nefrotik Sendrom Tanımı	3
I.B. Nefrotik Sendrom Epidemiyolojisi	3
I.C. Nefrotik Sendrom Klinik Sınıflandırılması.....	4
I.D. Nefrotik Sendrom Histolojik Sınıflandırılması	7
I.E. Nefrotik Sendromda Tedaviye Cevaba Göre Sınıflandırma	10
I.F. Nefrotik Sendrom Patogenez ve Patofizyolojisi	13
I.G. Nefrotik Sendrom Genetiği	17
I.H. Nefrotik Sendromda Klinik	18
I.I. Nefrotik Sendrom Komplikasyonları	19
I.J. Nefrotik Sendromda Laboratuvar	20
I.K. Nefrotik Sendromda Tedavi	24
I.L. Deneysel Nefrotik Sendrom.....	29
I.M. Nefrotik Sendromda Prognoz	30
II.Apoptozis ve Anti-Apoptotik Proteinler.....	31
II.A.a. Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü).....	31
II.B. Anti-Apoptotik Proteinler	48
III.Resveratrol	61
IV.Metformin	68
GEREÇ VE YÖNTEM	69
BULGULAR	74
TARTIŞMA VE SONUÇ	101
KAYNAKLAR	115
EKLER	145
EK-1: KISALTMALAR	145

EK-2: ŞEKİL DİZİNİ	148
EK-3: TABLO DİZİNİ.....	150
TEŞEKKÜR	151
ÖZGEÇMİŞ	152



ÖZET

Nefrotik Sendrom Oluşturulan Sıçanlarda Resveratrol ve Metformin Tedavilerinin Böbrek Dokusundaki Anti-Apoptotik Proteinlere Etkileri

Nefrotik sendrom (NS) çocukluk çağı böbrek yetmezliğinin önemli bir nedeni olmakla birlikte patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Apoptozis NS'de önemli bir hasar mekanizması olarak görülmektedir. Ancak NS'de ortaya çıkan apoptozis ile ilişkili anti-apoptotik proteinlerin böbrek doku düzeyleri ve bu proteinlere etkili olabilecek tedavi yöntemleri ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda adriamisin ile oluşturulan deneysel NS modelinde, pro-apoptotik kaspaz-3 ve anti-apoptotik proteinler olan XIAP ve survivin'in serum ve böbrek doku düzeyleri ölçülerek, potansiyel anti-apoptotik özelliklere sahip resveratrol ve metformin tedavilerine olan yanıtları araştırılmıştır. NS oluşturulmak üzere intra-peritoneal adriamisin verilen sıçanlar rasgele 3 gruba ayrıldı. Grup 1'deki sıçanlara (n=11) hiçbir tedavi verilmedi. Adriamisin verilmesini takip eden ikinci haftanın sonunda, dört hafta süre ile Grup 2'deki sıçanlara (n=8) resveratrol; Grup 3'teki sıçanlara (n=7) da metformin tedavileri verildi. Grup 4'teki sıçanlar (n=10) ise kontrol grubu olarak izlendi. Altıncı hafta sonunda elde edilen serum ve böbrek doku lizatında kaspaz-3, XIAP ve survivin düzeyleri ELİSA yöntemi ile ölçüldü. Deney gruplarındaki sıçanlara ait böbrek dokularında glomerüler, tübüler ve interstisyel hasarları belirlemek üzere skorelama yapılarak patolojik değerlendirme yapıldı.

Survivin, XIAP ve kaspaz-3'ün renal doku düzeyleri tedavi edilmeyen sıçanlarda kontrol grubu ile benzerdi. Resveratrol ve metformin ile tedavi edilen sıçanların renal doku survivin değerleri, tedavisiz gruba göre, istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi. Nefrotik sendromlu sıçanların serum survivin ve XIAP düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak

anlamalı yüksek bulundu. Serum kaspaz-3 düzeyleri ise kontrol grubuna göre düşüktü istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü. Resveratrol ve metformin tedavileri, eşit derecede olmak üzere, tedavisiz sıçanlara göre serum kaspaz-3 düzeylerini artırarak kontrol grubu ile benzer hale getirdi. Tedavisiz izlenen sıçanların böbrek dokusundaki iskemik kollapsın, resveratrol ve metformin tedavileri ile tedavi edilen hiçbir nefrotik sıçanda görülmedi. Serum total kolesterol ve trigliserid düzeyleri resveratrol ve metforminin tedavilerinden etkilenmedi. Resveratrol ve metformin ile glomerular hasarın istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı. Metformin tedavisi ile ayrıca interstisyel hasarlanma da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı. Resveratrol ve metformin tedavilerinin tubuler hasarı azaltmadığı görüldü. Resveratrol ve metformin tedavileri ile deney sonucunda ölçülen proteinüri düzeylerinde 4.haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu saptandı. Tedavi edilmeyen sıçanlarda ise proteinürinin artmaya devam ettiği belirlendi.

Sonuçlarımız resveratrol ve metforminin, halen kullanılan immunsupresif ilaçların yanında destek tedavileri olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Metformin ve resveratrol tedavilerinin nefrotik sendromlu hastalardaki etkinliğinin gösterilebilmesi için daha geniş çapta klinik ve laboratuvar çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Deneysel nefrotik sendrom, resveratrol, metformin, kaspaz- 3, XIAP, survivin.

SUMMARY

Effects of Resveratrol and Metformin Treatments on Anti – Apoptotic Proteins in Kidney Tissue in Rats with Nephrotic Syndrome

Nephrotic syndrome (NS) is an important cause of childhood renal failure, but its pathogenesis has not been fully elucidated yet. Apoptosis appears to be an important mechanism of injury in NS. However, there is not enough information about the kidney tissue levels of anti-apoptotic proteins associated with apoptosis in NS and the treatment methods that may be effective on these proteins. In our study, serum and kidney tissue levels of pro-apoptotic caspase-3 and anti-apoptotic proteins XIAP and survivin were measured and their responses to potential anti-apoptotic resveratrol and metformin treatments were investigated in adriamycin induced experimental NS model.

The rats that administered adriamycin intraperitoneally were randomly divided into 3 groups. The rats in group 1 (n=11) did not receive any treatment. At the end of the second week following adriamycin administration for four weeks rats in Group 2 (n=8) treated with resveratrol; group 3 (n=7) were also given metformin therapy. Rats in group 4 (n=10) were followed as control group. Caspase-3, XIAP and survivin levels were measured by ELISA method in serum and kidney tissue lysates obtained at the end of the sixth week. Pathological evaluation was made by scoring to determine the glomerular, tubular and interstitial damages in the kidney tissues of the rats in the experimental groups. Renal tissue levels of survivin, XIAP, and caspase-3 were similar in untreated rats to the control group. Renal tissue survivin values of rats treated with resveratrol and metformin showed a statistically significant decrease compared to the untreated group. Serum survivin and XIAP levels of rats with nephrotic syndrome were found to be statistically significantly higher than the control group. Serum caspase-3 levels were lower than the control group and statistically significantly lower.

Resveratrol and metformin treatments equally increased serum caspase-3 levels compared to untreated rats, making them similar to the control group. Serum total cholesterol and triglyceride levels were not affected by resveratrol and metformin treatments. Ischemic collapse in kidney tissue of untreated rats was not observed in any nephrotic rats with treated resveratrol and metformin. It was determined that glomerular damage was significantly reduced with resveratrol and metformin therapy. Interstitial injury also decreased statistically significantly with metformin treatment. Resveratrol and metformin treatments did not reduce tubular damage. It was found that there was a statistically significant decrease in proteinuria levels at the end of the experiment in nephrotic rats with resveratrol and metformin treatments compared to 4th week. It was determined that proteinuria continued to increase in untreated rats.

Our results show that resveratrol and metformin could be used as supportive therapies alongside currently used immunosuppressive drugs. Larger clinical and laboratory studies are needed to demonstrate the efficacy of metformin and resveratrol treatments in patients with nephrotic syndrome.

Key words: Experimental nephrotic syndrome, resveratrol, metformin, caspase-3, XIAP, survivin.

GİRİŞ

Nefrotik sendrom (NS) en sık görülen kronik böbrek hastalığıdır ve çocukluk çağında böbrek yetmezliğinin önemli bir nedenidir. NS patogenezindeki kronikleşme süreci tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte podositlerdeki hasar en temel bulgudur (1).

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, önemli bir doku homeostazisi olan ve normal organ involüsyonu, immün yanıt ve embriyogenez dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde ortak olan fizyolojik hücre ölümünün oldukça organize ve düzenlenmiş bir şeklidir (2). Apoptozis, nekrotik hücre ölümlerinden farklı olarak morfolojik nükleer değişikliklerle karakterize edilebilir. Apoptoz, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması, zar kabarması ve makrofajlar tarafından hızla fagositoza uğrayan apoptotik cisimlerin oluşumu ile aktif, yüksek düzeyde düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidir (3).

Apoptozisi tetikleyen esas faktör hücre içi sistein proteazların (kaspazların) çeşitli uyaranlar ile aktive olmasıdır (4). Apoptozisin gerçekleşmesi intrinsek ve ekstrinsek adı verilen 2 yolla oluşmaktadır. İntrinsek (mitokondrial) veya tip I yolda membran geçirgenliği bozulmuş olan mitokondrilerden sitokrom c'ler salınarak Apaf 1 ve başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 9 ile birleşerek apoptozom oluşmaktadır. Apoptozom başlangıçta inaktif halde bulunan sonlandırıcı kaspazlardan olan prokaspaz 3 ile birleştikten sonra prokaspaz 3, kaspaz 3 formuna dönüşerek aktifleşmekte ve sonuç olarak apoptoz gerçekleşmektedir (5). Ekstresek yolda ise (transmembran) veya tip2 yolda 2 hücre dışı sinyallerle CD95 ligandına (Fas ligand= CD95L) bağlanan tümör nekrozis faktör- alfa (TNF-alfa) tarafından uyarılmaktadır. Bu bağlanma, reseptörde ATP'den bağımsız değişikliklere neden olarak ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumuna neden olur. CD95 adaptör molekül Fas reseptörü ilişkili ölüm ünitesi (FADD) ile FADD da prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 ile birleşerek DISC kompleksini oluşturmaktadır. Bu sonraki adımda prokaspaz-8

aktifleşerek, kaspaz-3'ten proteoliz ile küçük alt ünitenin ayrılmasına ve böylece enzimin aktifleşmesine neden olmaktadır. Bu yolak kaspaz-3 aktivasyonu üzerinden mitokondriyal yolak ile birleşerek apoptoz sinyalini güçlendirmektedir (4).

Kaspaz molekülleri, apoptotik süreçte anahtar görev olan esas proteinlerdir (6). Kaspazlar, sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunur. Fakat proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerler ve böylece kaspaz aktivasyon zinciri başlar. Kaspaz türleri 3'e ayrılmaktadır. Bunlar: Başlatıcı kaspazlar, etkili (efektör) kaspazlar ve enflamatuvar kaspazlardır (7). Bizim çalışmamızda efektör kaspazlar olan kaspaz 3 düzeyi çalışılarak apoptozis durumunu saptanmaya çalışılmıştır.

Apoptozis podosit hasarına ve glomerüloskleroza neden olabilecek önemli bir süreç olarak görülmektedir (8). NS'de apoptozisi uyaran çeşitli faktörler saptanmıştır. Örneğin retinoik asit reseptörü yanıt veren protein 1 uyarısı p53 aktivasyonu ve podosit apoptozu ile sonuçlanır (9). Ancak NS'de ortaya çıkan apoptozis ile ilişkili anti-apoptotik proteinlerin böbrek doku düzeylerindeki değişimler ve bu proteinlere etkili olabilecek tedavi yöntemleri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Resveratrol, stilben ailesine ait bir polifenolik fitoaleksindir ve anti apoptotik etkilere sahiptir. Resveratrolün renal epitel hücreleri (sisplatin tosisitesinde anti-apoptotik Bcl-2 ve survivin protein seviyelerini artırarak) ve podositlerde (mitokondriden sitokrom C ve diablo gibi proapoptotik proteinlerin salınımı azaltarak podosit hasarının önleyebilir) anti apoptotik etkiler gösterdiği bulunmuştur (10). Benzer bir etki diabetik ratlardaki podositler ve epitelyal hücrelerde de gözlenmiştir (10).

Metformin, 5' Adenozin monofosfatla aktive olan Protein Kinazın (AMPK) dolaylı aktivasyonu yoluyla etki gösteren, tip 2 diyabetes mellitus tedavisinde yaygın olarak kullanılan oral bir antihiperglisemik ilaçtır (11). Metformin renal tübüler hücreleri inflamasyon, apoptoz, reaktif oksijen stresi, endoplazmik retikulum stresi, epitelyal-mezenkimal geçişten korur (12). Ayrıca, metforminin kompleks 1'de reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azalttığı ve mitokondriyal aracılı apoptozu önlediği bildirilmiştir (12), bu da

hücre ölümüne karşı koruma sağlayabileceğini düşündürmektedir ve renal fibrozun belirteç protein ekspresyonlarını önemli ölçüde azaltabilir. Metformin ve böbrek hastalıklarına ilişkin veriler daha çok akut böbrek hasarı, diyabetik nefropati, polikistik böbrek hastalıkları, kronik böbrek yetersizliği ilişkili olup metforminin nefrotik sendromda gelişen apoptozise olan etkileri ile ilgili yeterli bilgi yoktur. Metformin kronik böbrek hastalığında olduğu gibi, nefrotik sendromda da renal AMPK'yi aktive ederek mitokondriyal biyogenez artışı ile birlikte, albüminüri seviyelerini ve renal fibrozun belirteç protein ekspresyonlarını önemli ölçüde azaltabilir (12) .

Böbrek doku düzeyi düşük anti-apoptotik proteinlerin saptanması, NS patogenezinin ışık tutacağı gibi, düşük olan proteinin yerine konması ve/veya artışı için ilaç geliştirilme olasılığını da gündeme getirecektir. Bu çalışmada amaç adriamisin ile NS oluşturulan ratlarda anti-apoptotik proteinler olan kaspaz-3, x'e bağlı apoptoz inhibitör protein (XIAP) ve survivin'in böbrek dokusundaki düzeylerinin ölçülmesi, anti apoptotik protein düzeylerinin resveratrol ve metformin tedavileri ile olan değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

I.Nefrotik Sendrom

I.A. Nefrotik Sendrom Tanımı

Nefrotik Sendrom (NS); glomerüler filtrasyon bariyerinde geçirgenlik artışı sonucu meydana gelen, masif proteinüri (idrar protein düzeyinin 40 mg/m²/saat'in üzerinde olması veya spot idrar protein/kreatinin oranının 200 mg/mmol'ün üzerinde olması), proteinüri sonucu ortaya çıkan hipoproteinemi (hipoalbuminemi; serum albumin düzeyinin 2,5 g/dl altında olması) ve ödem ile karakterize, hipertrigliseridemi ve hiperkolesteroleminin de eşlik ettiği klinik tablodur (13-15).

I.B. Nefrotik Sendrom Epidemiyolojisi

Nefrotik sendrom çocuklarda önemli bir kronik hastalıktır. Sağlıklı çocuklarda tahmini yıllık nefrotik sendrom (NS) insidansı, 18 yaşından küçük

100.000 çocuk başına iki ila yedi yeni vakadır. Küçük yaş gruplarında erkeklerde kızlara göre daha sık görülür, ancak adölesan dönemde cinsiyetler arasında anlamlı bir fark yoktur. Afrika kökenli Amerikalı ve Hispanik popülasyonlarda artan insidans ve daha şiddetli hastalık görülmektedir (14).

Erkek çocuklarda kızlara göre yaklaşık iki kat daha sıktır. Bu oran adölesan ve erişkin dönemde eşitlenir (15). Sıklıkla 2-6 yaşları arasında başlar. Bir yaş altı ve 9 yaş üstünde nadir görülür. Hasta çocukların %2-8 kadarında aile bireylerinde, en sık da kardeşlerde NS öyküsü vardır (16). NS'un, HLA-DR7, HLA-B8 doku grupları ile ilişkisi gösterilmiştir. Atopisi olan çocuklarda HLA-B12 doku grubu birlikteliği olduğunda NS riskinin 13 kat arttığı bildirilmiştir (17).

Çocukluk çağı NS insidansı dünya çapında coğrafi konum ve etnik kökene göre değişkenlik göstermekle beraber 100.000 çocuk başına 4,7'dir (18). Birkaç Avrupa çalışmasında, Güney Asyalı çocukların Avrupa popülasyonundan daha yüksek bir NS insidansına sahip oldukları bildirilmiştir. Ayrıca ABD araştırmalarından elde edilen tarihsel verilerde Afrikalı-Amerikalı çocuklarda NS görülme sıklığının Avrupa'daki çocuklara göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (13). Afrikalı-Amerikalı çocuklarda ayrıca böbrek biyopsisinde FSGS olma olasılığı daha yüksek (%42-72) ve genel olarak SDBY'ye ilerleme olasılığı Avrupalı çocuklara göre daha fazladır (13).

I.C. Nefrotik Sendrom Klinik Sınıflandırılması

Nefrotik sendrom, primer veya sekonder etiyolojilere sahip olabilir. Primer NS'da, altta yatan başka kronik bir hastalık olmaksızın, kliniğe izole olarak böbrekteki değişiklik sebep olmaktadır (19). Nefrotik sendromun en sık görülen nedeni idiyopatik nefrotik sendromdur (16). 1 ila 10 yaş arasındaki vakaların yüzde 90'ından fazlasını, 10 yaşından sonraki vakaların da yüzde 50'sini oluşturur (20).

Nefrotik sendromun birincil nedenleri minimal değişiklik hastalığı (MDH), primer ve sekonder membranöz nefropati ve FSGS'dir. Çocuklarda

en sık görülen neden minimal değişiklik glomerülonefrittir (21)(tablo-1). 10 yaşın altında, hipertansiyon ve 4 hematürinin eşlik etmediği, normal kompleman düzeyleri ile normal böbrek fonksiyonlarına sahip olan hastalarda diğer glomerül patolojilerden ziyade MDH düşünülür (20). Yaş kriterinin istisnası; yaşamın ilk yılında (özellikle ilk 3 ayda) başlayan nefrotik sendrom muhtemel bir genetik mutasyon varlığına ve glukokortikoid direncine işaret eder (22). Bu bilgilere dayanarak, genellikle klinik tanıya dayalı olarak MDH olma ihtimali olan çocuklara ilk olarak glukokortikoid tedavisi uygulanır ve böylelikle ilk basamakta böbrek biyopsisinden kaçınılır (23).

Sekonder nefrotik sendrom, sistemik hastalıklarla ilişkili nefrotik sendrom olarak tanımlanır veya glomerüler hasara neden olan başka bir sürece ikincildir (21). Nefrotik sendromun sekonder nedenleri diyabetes mellitus, lupus nefriti, amiloidoz ve multipl miyelomdur. Not olarak, IgA nefropatisi ve membranoproliferatif glomerülonefrit de nefrotik sendrom olarak ortaya çıkabilir, ancak aynı zamanda nefritik bir bileşenle de olabilir (21)(tablo-1). Sekonder NS, yaş>8 ise; hipertansiyon, hematüri, böbrek fonksiyon bozukluğu, böbrek dışı bulgular (döküntü, ateş, artralji, artrit), serum kompleman seviyelerinde düşüklük varsa düşünölmelidir (24). Akut poststreptokoksik glomerülonefrit, lupus nefriti, Alport sendromu, HSP nefriti gibi pek çok glomerüler hastalığa sekonder NS gelişebilir (13). Çocukluk çağı başlangıçlı SLE nadir fakat ciddi, birçok sistemi tutan otoimmün bir hastalıktır. Böbrek tutulumu bu hastaların %50-75'inde görülür ve artmış morbidite ve mortalitenin temel sebebidir (25). Alport sendromu sensörinöral işitme kaybı ve göz bulguları (anterior lentikonus) ile birlikte olan herediter bir glomerülonefrittir. Glomerüler bazal membranın bir komponenti olan tip 4 kollajenin alfa zincirlerini kodlayan genlerdeki mutasyon sonucu gelişir ve son dönem böbrek yetmezliğine ilerler (26). HSP çocuklardaki sistemik vaskülitlerin en yaygın görölenlerinden birisidir ve %30-50'sinde HSP nefriti gelişmektedir. Glomerüllerde IgA1 içeren immün komplekslerin depolandığı HSP nefriti genelde ılımlı seyrederek fakat küçük bir kısmı son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyebilir (27).

Tablo-1: Nefrotik sendromun etyolojisi ve sınıflandırılması (21,28-30).

İdyopatik	• Minimal değişiklik hastalığı (MDH) • Fokal segmental glomeruloskleroz (FSGS) • Mesengial proliferatif glomerulonefritis • Membranoproliferatif glomerulonefritis • Membranöz nefropati (MN) • IgM nefropatisi • C1q nefropatisi
Genetik hastalıklar	• Podosin gen mutasyonuna bağlı otozomal resesif FSGS (NPHS2) • WT1 gen mutasyonuna bağlı otozomal dominant difüz mezengial skleroz (DMS) • α-aktinin 4 mutasyonuna bağlı otozomal dominant FSGS • CD2-bağılantılı protein gen defektine bağlı otozomal dominant FSGS (CD2AP) • Transient reseptör potansiyel katyon kanalı 6 gen defekti bağlantılı otozomal dominant FSGS (TRPC6)
Enfeksiyonlar	• Hepatit B ve C • İnsan immün yetmezlik virüsü • Malaria • Şistozomiyazis
Sistemik hastalıklar	• Henoch-Schönlein purpurası • Sistemik lupus eritematozus • Diabetes mellitus • Sarkoidozis
Metabolik hastalıklar	• Fabry hastalığı • Glutarik asidemi • Glukoje depo hastalığı • Mitokondrial sitopatiler
Hematolojik ve onkolojik hastalıklar	• Lösemi • Lenfoma • Sickle cell hastalığı
İlaçlar	• Nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar (NSAİİ) • Altın • Penisilamin • Anjiotensin konverting enzim inhibitörleri • Pamidronat • Interferon • Lityum
Diğer	• Arı sokması • İlaç alerjisi • Obesite • Gebelik

I.D. Nefrotik Sendrom Histolojik Sınıflandırılması

Nefrotik sendromun histopatolojik sınıflandırması ışık mikroskopunda görülen glomerüler değişikliklere göre yapılmaktadır. Bu ayırım daha sonra immünfloresan ve elektron mikroskopik incelemelerle de desteklenmiştir. NS'nin histopatolojik sınıflandırması Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo-2: Nefrotik sendrom histolojik sınıflandırılması (21).

Minimal Değişiklik Hastalığı (MDH)
Fokal Glomerülosklerozis (FGS) • Fokal Segmental Glomerülosklerozis (FSGS) • Fokal Global Glomerülosklerozis (FGGS)
Mezengial Proliferasyon (MezPGN) • Pür Diffüz Mezengial Proliferasyon • Sklerozan Glomerülonefritis
Membranoproliferatif Glomerülonefrit (MPGN) C3 glomerulopati (C3G) İmmün kompleks aracılı MPGN • Tip-I MPGN; Subendotelyal depolanma • Tip-II MPGN; İnteramembranöz dens depozitler • Tip-III MPGN; Transmembranöz depolanma
Membranöz Glomerülonefrit (MGN)
Kronik Glomerülonefrit

Minimal Değişiklik Hastalığı (MDH)

Minimal değişiklik hastalığı (MDH), ödem ve intravasküler hacim azalmasına yol açan yoğun proteinüri ile karakterize idiyopatik nefrotik sendromun (NS) başlıca nedenidir (23). Çocuklarda nefrotik sendrom vakalarının %70 ila %90'ını oluşturur (31). Minimal değişiklik hastalığı için, steroidlere iyi yanıt veren ve ödem ve intravasküler hacim azalmasıyla sonuçlanan proteinüri ayırt edicidir (32).

Çocuklarda MDH, idiyopatik nefrotik sendromun en sık nedenidir. Çocuklarda MDH öncelikle klinik bir tanıdır ve biyopsi yalnızca atipik klinik özelliklerin varlığında gereklidir. Biyopsi gerektiren durumlar: Başlangıç yaşı <1 veya >12 yaşında olan olgular, gros hematüri, düşük serum C3, hipertansiyon, yüksek kreatinin düzeyleri, hipovolemi olmaksızın böbrek yetmezliği, sekonder nedenler açısından pozitif öykü veya seroloji [antinükleer antikorlar, hepatit B ve C serolojik testleri, sifiliz için serolojik test, HIV antikor testi, kompleman seviyeleri (CH50, C3, C4)], steroid tedavi direnci olması durumunda biyopsi gereklidir (32).

Fokal Segmental Glomerülosklerozis (FSGS):

Fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS), glomerüllerin sadece bir kısmının (fokal) etkilenmesi ve bu glomerül yumağının bir bölümünde (segmental) skleroz gelişmesi ile karakterizedir (34). Klinik olarak FSGS, steroide dirençli nefrotik sendromun (SDNS) yaygın bir nedenidir ve FSGS'li çocukların yaklaşık %30-50'si steroid tedavisine yanıt vermez.

Fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS), skleroz, hyalinosis, köpük hücre infiltrasyonu, podositlerin vakuolizasyonu ve podosit prekürsör proliferasyonu ile karakterize histolojik bir yaralanma paternidir. Sadece bazı glomerüllerin etkilenmesi açısından “fokal” ve etkilenen glomerülün yalnızca bir kısmının sklerozu nedeniyle “segmental”dir (33).

FSGS heterojen bir hastalıktır. Genetik anormalliklerden veya proteine glomerüler geçirgenliği artıran dolaşımdaki bir faktörün üretiminden kaynaklanıyorsa birincil olarak kabul edilir. İkincil nedenler arasında böbrek kütlesinde azalma, enfeksiyonlar, ilaçlar yer alır (34-35).

Glomerülosklerozlu hastalar çok çeşitli immünosupresif ilaçlarla tedavi edilir. Çoğu hasta başlangıç tedavisi olarak bir kortikosteroid tedavisi alır. Kalsinörin inhibitörleri en yaygın ikinci basamak ajandır. Diğer seçenekler arasında alkileyici ajanlar, mikofenolat mofetil gibi anti-proliferatif ilaçlar ve rituksimab gibi biyolojik ajanlar bulunur. Bununla birlikte, bu

tedaviler, hastaların az bir kısmında tam veya kısmi remisyon sağlanmasında etkilidir (36).

Mezengioproliferatif Glomerülonefrit (MezPGN):

Mezengioproliferatif glomerülonefrit'de klinik ve laboratuvar bulguları MDH'ye benzer. Ancak hematüri daha sıklıkla görülür. Böbrek biyopsisinin ışık mikroskopisi ile incelenmesinde mezengial matriks ve mezengial hücre artışı gözlenir (37). İmmün floresan inceleme ile mezengiyumda IgM ve serum kompleman 3 (C3) depolanması saptanabilir. Bu histolojik yapıya diğer bazı sekonder NS türlerinde de rastlanır. Hastaların bazıları spontan olarak, bazıları steroidlerle, bir bölümü de steroid ve immunsupresif ilaçların kombine kullanılması ile remisyona girer. Prognoz genellikle iyidir.

Membranoproliferatif Glomerülonefrit (MPGN):

Membranoproliferatif glomerülonefrit (MPGN), klinik olarak proteinüri, hematüri, hipertansiyon ve hastalığın başlangıcında sıklıkla bozulmuş böbrek fonksiyonu ile karakterize nadir bir patolojik glomerülopati paterni olarak kabul edilmiştir (38)(39). Tüm glomerüler hastalıklardan %7 ila %10'unu temsil eder (40). Son araştırmalar, MPGN insidansının 21. yüzyılda önemli ölçüde azaldığını, ancak SDBY'ye ilerleme ve ölüm oranlarının değişmediğini gösterdi (41)(42). Etkilenen çocukların %50 kadarında MPGN, on yıl içinde son dönem böbrek hastalığına (SDBY) yol açar (43).

MPGN'nin ışık mikroskobu (LM) üzerindeki tipik özellikleri arasında mezangial selülarite, endokapiller proliferasyon ve kılcal duvar yeniden şekillenmesi (çift kontur oluşumu ile) ve glomerüler kümelerin lobüler vurgulanması yer alır (44). İmmünfloresan bulgularına dayalı olarak MPGN, kompleman aracılı C3 glomerulopati (C3G) ve immün kompleks aracılı MPGN(IC-MPGN) olarak sınıflandırılmıştır (44). Primer C3G ve IC-MPGN nadirdir ve Avrupa'da 100.000 popülasyonda tahmini prevalansı 12-16'dır (45). Genel olarak, sonuç kötüdür. Hem yetişkinlerde hem de çocuklarda bildirilen ilgili prognostik faktörler, başlangıçta NS'yi ve böbrek biyopsilerinde

daha yüksek oranda sklerotik glomerül ve kresentleri içerir (46). SDBY riski C3G ve IC-MPGN için benzerdir (%4-41'e karşı %9-41) (47).

Membranöz Glomerülonefrit (MGN)

Membranöz glomerulonefrit (MGN), böbrek glomerülünün otoimmün bir hastalığıdır ve nefrotik sendromun önde gelen nedenlerinden biridir (48)(49). Vakaların yaklaşık %30'u son dönem böbrek hastalığına ilerler (49). Membranöz glomerulonefrit (MGN), etiyolojisi bilinmeyen (birincil MGN/PMGN veya idiyopatik MGN/IMGN) ve kanserler, hepatit B gibi enfeksiyonlar, ilaç reaksiyonları ve otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere diğer durumların neden olduğu sekonder (ikincil MGN/SMGN) vakalardan oluşur. Primer ve sekonder membranöz glomerülonefrit, MGN vakalarının sırasıyla yaklaşık %75-80'ini ve %20-25'ini oluşturur (50).

Tedavi edilmeyen olguların, özellikle anti fosfolipaz a2 reseptör (anti-PLA2R) antikoru saptanmayan veya düşük olan olguların yaklaşık üçte biri spontan remisyona girer, üçte biri 10 yıl içinde SDBY'ye ilerler ve geri kalanında ilerleyici olmayan KBH gelişir (51).

I.E. Nefrotik Sendromda Tedaviye Cevaba Göre Sınıflandırma

Sınıflandırma, steroidde duyarlı veya steroidde dirençli NS (SRNS) olarak glukokortikoidlerle (Gc) tedaviye verilen cevaba dayanır (52).

I.E.a. Steroide Yanıtlı NS (SYNS)

Pediyatrik NS vakalarının yaklaşık %80'i Gc'ye yanıt verir ve kalan %20'si steroidde dirençlidir. Steroide yanıt veren hastaların büyük çoğunluğu için tedavinin temel dayanağı prednizondur (28). Genel olarak uzun vadeli böbrek sonucu açısından prognoz, steroidde yanıt veren hastalık için mükemmeldir. Çocukların çoğu 4 hafta içinde steroidlere iyi yanıt verir; bununla birlikte, çoğu nüks edecek ve yaklaşık yarısı sıklıkla nüks eden veya steroid bağımlı hale gelecektir.

I.E.b. Steroide Bağımlı NS (SBNS)

Steroid bağımlı nefrotik sendrom, steroid tedavisi kesilirken veya steroidin kesilmesinden sonraki 2 hafta içinde meydana gelen iki ardışık nüks görülmesidir (28). SBNS tedavisinde oral prednizon tam remisyon sağlanana kadar devam edilir. Tam remisyon sağlandıktan sonra remisyon halini sürdürecektir en düşük dozda gün aşırı prednizona en az üç ay devam edilir. Ciddi yan etkilerin olmadığı durumlarda gün aşırı tedavi etkili olmuyorsa remisyon halini sürdürecektir en düşük dozda günlük prednizon verilebilir (53).

I.E.c. Steroide Dirençli NS (SDNS)

Steroid dirençli nefrotik sendrom, en az 8 haftalık kortikosteroid tedavisine rağmen tam remisyon sağlanamamasıdır. Vakaların çoğunda fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS) ve daha az ölçüde, minimal değişiklik hastalığı (MCD) veya yaygın mezangial skleroz (DMS) görülür (54). Ayrıca, SDNS izole bir böbrek hastalığı olarak veya daha az sıklıkla böbrek dışı belirtilerle ilişkili sendromik bir bozukluk olarak ortaya çıkabilir. SDNS'nin başlangıcında ve klinik seyrinde önemli bir heterojenlik vardır ve ne klinik özellikler ne de histolojik model tedaviye yanıtı öngörmez. Bununla birlikte, SDNS'nin bir dizi immünosupresif ajana direnç göstermesi ve daha hızlı bir oranda son dönem böbrek hastalığına (SDBY) ilerleme olasılığı daha yüksektir (52,55). Bu çocukların %8-35'i tanıdan sonraki 5 yıl içinde son dönem böbrek hastalığına ilerleyecektir (56-57).

I.E.d. Remisyon

Remisyon, proteinüride belirgin bir azalma (<4 mg/m²/saat veya idrar çubuğu ile albümin seviyesinin 3 ardışık gün boyunca negatif olması) ve ödemin gerilemesi birlikte serum albümin düzeyinin 3,5g/dl üzerine çıkması ile karakterizedir.

I.E.e. Relaps:

Nüks, ödemin yeniden görülmesiyle beraber >40 mg/m²/saat proteinüri olması, protein/kreatinin oranının >2 mg/mg olması veya arka

arkaya bakılan 3 idrar çubuğunda albümin seviyesinin $\geq 2+$ olması ile karakterize masif hastalığın tekrarlaması olarak tanımlanır.

I.E. Nefrotik Sendrom Etyolojisi

Nefrotik sendromlu çocuğun yaşı olası nedeni belirlemede en önemli faktördür. Konjenital nefrotik sendrom (yaşamın ilk 3 ayında ortaya çıkar) genellikle genetik bir nedene bağlıdır, ancak konjenital bir enfeksiyona sekonder olarak ortaya çıkabilir (16,58). İnfantil nefrotik sendromun (3-12 aylarda sık) da genetik olması muhtemeldir. İdiyopatik nefrotik sendrom en sık olarak 2 ila 7 yaşları arasında ve erkeklerde görülür (erkek-kadın oranı:3,8:1) (28). Bu çocukların çoğunda kortiko steroidlere yanıt veren MLH vardır, ancak steroide dirençli hastalık, tipik olarak idiyopatik FSGS de ortaya çıkabilir (28).

Daha büyük çocuklarda ve özellikle adöloşanlarda, MLH daha az görülmekle birlikte, primer FSGS, membranöz nefropati (MN) ve membranoproliferatif glomerülo nefrit (MPGN) küçük çocuklara göre daha yaygındır (30). Büyük çocuklar ve adöloşanlar ayrıca sekonder nedenler açısından yüksek risk altındadır (örneğin, sistemik lupus eritematozus [SLE], hepatit B ve C, insan immün yetmezlik virüsü [HIV])(30).

Ailede nefrotik sendrom, FSGS, kronik böbrek hastalığı veya akraba evliliği öyküsü bulunması durumunda, genetik bir neden düşünülmelidir. Ayrıca konjenital anomali varlığında, genetik bir neden düşünülmelidir (59).

Özellikle T lenfositlerdeki disfonksiyon ve disregülasyonun nefrotik sendrom patogeneğinde rolü olduğu düşünülmektedir (60). İmmüsupresan ajanların tedavide yer alması bu durumu destekler niteliktedir. Aktive edilmiş lenfositlerce üretilen birtakım plazma faktörlerinin kapiller duvar geçirgenliğini artırarak nefrotik sendrom kliniğine neden olabileceği gösterilmiştir (61).

I.F. Nefrotik Sendrom Patogenezi ve Patofizyolojisi

Podosit ve Glomerüler Filtrasyon Bariyeri Kusurları

Podositler, böbreğin glomerüler bazal membran filtrasyon mekanizmasını desteklemek ve sürdürmek için işlev gören oldukça farklılaşmış hücrelerdir. Bu hücreler glomerüler kılcal damarları saran birçok ayaksı çıkıntıdan oluşur. Ayaksı çıkıntılar, birlikte glomerüler filtreyi oluşturan slit diyafram adı verilen özel hücre-hücre bağlantılarıyla iç içe geçer. Karmaşık bir hücre iskeleti, glomerüler membran boyunca farklı moleküler hareketlere yanıt olarak hidrostatik basınçlarda değişikliklere izin vermek için podosit hücre gövdesinin yapısını ve ayaksı çıkıntıları destekler. Podosit hücrelerinin bölünmesi ve yenilenmesi sınırlıdır ve bu nedenle yaralanmaya karşı savunmasızdır (24). Kritik bir düzeyin üzerindeki podositlerin yok edilmesi (>% 20) aynı zamanda geri dönüşü olmayan glomerüler hasara yol açar ve glomerüloskleroz gelişimine ve ilerleyici böbrek fonksiyonu kaybına neden olur (62).

Podosit yapısındaki ve işlevindeki genetik mutasyonlar, çoğunlukla doğuştan veya SRNS olarak ortaya çıkan böbrek fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanır. En erken tanınan genetik bozuklukların bazıları, slit diyafram proteinleri nefrin (NPHS1) ve podosin (NPHS2) kodlayan genleri içeriyordu (63). CD2AP ve INF2 dahil olmak üzere podosit aktin hücre iskeletini kodlayan genlerdeki mutasyonlar da SRNS fenotipleriyle ilişkilidir. Son olarak, podosit nükleer proteinleri (WT1), glomerüler bazal membran proteinleri (LAMB2) ve mitokondriyal proteinler (COQ2) glomerüler filtrasyon disfonksiyonundan sorumludur ve bu daha ciddi ilerleyici podositopatiye yol açar (24).

İmmün Disregülasyon

Kortikosteroidlerle immünosupresyon, nefrotik sendromun tedavisinin temel dayanağı olduğundan, immün düzensizliğin hastalık gelişiminde patojenik bir rol oynadığından şüphelenmek mantıklıdır. Bu immün düzensizlik hipotezi, başlangıçta, alerjenlere maruz kaldıktan sonra ortaya çıkan NS'nin klinik gözlemlerinden ileri sürülmüştür (64). Ayrıca, Hodgkin ve diğer T hücreli lenfomaların nefrotik sendromu tetikleyebileceğine ve

kemoterapinin daha sonra remisyona neden olabileceğine dair kanıtlar vardır (65). Kızamık enfeksiyonu, hücre aracılı bağışıklığın ve T hücre alt kümelerinin depresyonu yoluyla NS'de geçici bir spontan remisyona da neden olabilir (66). Belirli bir sitokin nefrotik sendromu tetiklemese de, klinik hastalık oluşum paternleri kesinlikle hastalığın patofizyolojisinde T hücre düzensizliğinin bir rolü olduğunu düşündürmektedir (24).

T Hücre Teorisi

Prednizolonun önemli rolü ve SSNS tedavisinde immünosupresif ajanların etkinliği, hastalığın patogenezinde bağışıklık sistemini güçlü bir şekilde etkiler. Nefrotik sendromda (NS) T hücrelerinin katılımı 1970'lerde bildirilmiştir (67). Bu T hücresi teorisinin ana temeli şu şekildedir.

- Glomerüllerde rutin immünoglobulin veya kompleman birikiminin olmaması, humoral faktörlerin dahil olduğunu düşündürür.
- T hücre fonksiyonunu baskılayan immünosupresanlar (kortikosteroidler, siklosporin ve siklofosfamid) etkilidir.
- Bazı vakalarda, T hücre fonksiyonunu bozan kızamık enfeksiyonunu takiben remisyon sağlanır (66).

B Hücre Teorisi

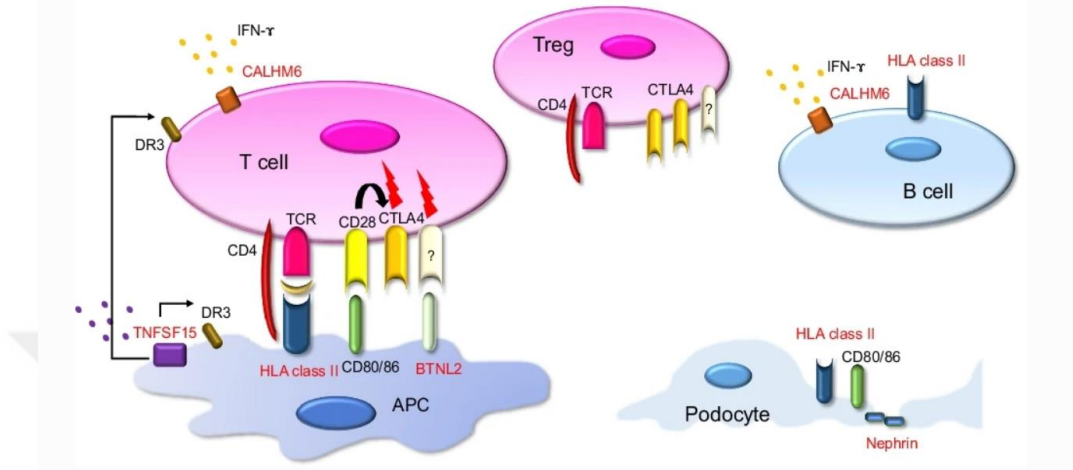
B hücrelerini tüketen monoklonal antikor rituksimabın (RTX) (68) oldukça etkili terapötik etkilerine dayanarak, 2010'larda B hücrelerinin hastalıkla ilişkili olduğu hipotezi önerildi. RTX, başlangıçta B hücreli Hodgkin olmayan lenfomayı tedavi etmek için geliştirilmiş kimerik bir anti-CD20 monoklonal antikordur (69). CD20, pro-B fazından, sonunda plazma hücrelerine farklılaşana kadar tüm B hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilir. NS'de B hücresi tükenmesinin paralel olarak ortaya çıkması ve hastalık aktivitesinde bir azalma, B hücre patolojisinin doğrudan dahil olduğunu kuvvetle gösterir (70). Ayrıca, RTX uygulamasından sonra nüks ile en çok ilişkili olan lenfosit alt kümesi, bellek B hücreleridir (71). Ek olarak, SSNS'nin

nüksetmesini önlemede yararlı olan mikofenolat mofetil, bellek B hücrelerini baskın olarak baskılar ve B hücrelerinin de patogenezinde rol oynadığını düşündürür (72). NS'yi kontrol etmede RTX'in etkinliği için bir başka olası mekanizma, glomerüller veya T hücreleri üzerindeki doğrudan etkisidir. Çeşitli immünosupresif ajanlar, yalnızca immün hücreler üzerinde değil, aynı zamanda doğrudan podositler üzerinde de etki gösterir (73). RTX ayrıca glomerüler epitel hücrelerinde eksprese edilen asit sfingomiyelinaz benzeri fosfodiesteraz 3b'ye de bağlanır (74). Bununla birlikte, farklı karşılık gelen epitoplara sahip hümanize bir anti-CD20 monoklonal antikoru olan ofatumumab, SSNS'li hastalarda da etkilidir (75). Bu nedenle, RTX'in doğrudan etkisinin B hücreleri aracılığıyla uygulandığı düşünülmektedir. B hücreleri ayrıca genel antijen sunumunda T hücreleri ile etkileşime girer; buna bağlı olarak, bağışıklık sistemi son derece iç içedir, böylece her iki hücre tipi birbirinden ayrılamaz.

CD80 ve insan lökosit antijeni sınıf II

B-hücre ve T-hücre etkileşimi için önemli olan CD80 (B7-1), SSNS ile ilişkisi nedeniyle büyük ilgi görmüştür. CD80, aktive edilmiş B hücrelerinde ve antijen sunan hücrelerde eksprese edilen bir transmembran proteinidir. Antijen sunumu sırasında, CD80, Th hücreleri üzerindeki CD28'e veya Treg hücreleri üzerindeki sitotoksik T-lenfosit-ilişkili-4'e bağlanır ve T hücrelerinin aktivasyonunu veya inaktivasyonunu kontrol eder (76) (Şekil 3). Podositler oldukça farklılaşmış glomerüler spesifik hücreler olmasına rağmen, CD80'i eksprese ederler ve immünojenik yönlerle sahiptirler (77)(Şekil 3). Bununla birlikte, üriner CD80'in minimal değişiklik hastalığı ile fokal segmental glomerüler sklerozu veya sitotoksik T-lenfosit-ilişkili-Ig'nin refrakter NS'de etkili olup olmadığını ayırt etmede yararlı olup olmadığı açık değildir (78). Podositler, insan lökosit antijeni (HLA) sınıf II'yi eksprese eder ve bağışıklık hücreleri olarak işlev görür (79). HLA, T hücreleri gibi konakçı bağışıklık sistemine spesifik antijen peptitleri sunan bir hücre yüzeyi molekülüdür (80). HLA sınıf II'nin anormal ekspresyonu, antijen sunan hücrelerde ve çeşitli organlarda otoimmün hastalıklara neden olur (81). Bu

gerçekler, podositlerin NS'nin patogeneğinde bağışıklık hücreleri gibi davranabileceğini düşündürmektedir.



Şekil-1: SSNS'nin patogeneğinde muhtemelen rol oynayan moleküller (82).

APC: antijen sunan hücre; **TCR:** T hücre reseptörü; **Treg:** düzenleyici T hücresi; **BTNL2:** butirofilin benzeri 2; **CTLA4:** sitotoksik T-lenfosit ilişkili-4; **IFN-γ:** interferon-gama; **TNFSF 15:** tümör nekroz faktörü aile üyesi 15; **DR3:** ölüm reseptörü 3.

Daha yakın zamanlarda, hastalıklı podositlerde eksprese edilen bir T hücresi ortak uyarıcı molekülü olan CD80 (B7-1), NS tedavisinde inhibitör tedavi için olası bir hedeftir (83); bununla birlikte, çalışma sonuçları yetersizdir (84).

Sistemik Dolaşım Faktörleri

Dolaşımdaki geçirgenlik faktörleri, FSGS nedeniyle yapılan böbrek transplantasyonundan sonra proteinürinin tekrarlaması (85) ve özellikle nakil sonrası erken dönemde plazma değişiminden sonra FSGS'nin remisyonuyla kanıtlandığı gibi, nefrotik sendromun patogeneğinde de rol oynayabilir (86). Ayrıca, FSGS'li hastalardan alınan serum, sıçan böbreklerinde proteinüriyi indüklemiş ve ex vivo albüminin glomerüler geçirgenliğini artırmıştır (87),

FSGS'li anneden bebeğe geçiş olmuş (88) ve FSGS'li bir böbreğin FSGS'li bir alıcıya implantasyonu hastalık remisyonuna neden olmuştur (89).

MDH ve FSGS'de, özellikle vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) ve hemopeksin olmak üzere, MDH ortamında glomerüler geçirgenliği değiştirdiği varsayılan birçok dolaşım faktörü türü rapor edilmiştir (90). Hemopeksin'in podosit hücre iskeletini değiştirdiği ve böylece glomerüler membran boyunca albümin difüzyonunu arttırdığı düşünülmektedir (91). Steroide yanıt veren NS'li çocukların idrarında tanımlanmış ve daha sonra remisyon sırasında kaybolduğu gösterilmiştir (91). Dolaşımdaki faktörün glikokaliksteki galaktoz kalıntılarına bağlanabileceği de öne sürülmüştür (92).

FSGS'de, aktif FSGS'li hastalarda serumdan izole edilen ve ex vivo modellerde glomerüllerde nefrin ekspresyonunun azalmasının yanı sıra albümine karşı artan glomerüler geçirgenliğe yol açan kardiyotrofin benzeri sitokin 1 (CLC-1) gösterilmiştir (93). Daha yakın zamanlarda, çözünür ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörü (suPAR), FSGS'ye neden olan bir dolaşım faktörü olarak dikkat çekmiştir (24). Yine suPAR, hasta serumundan izole edilen bir maddeydi ve podosit hücre iskeletini deforme ederek etki ettiği düşünülmüştür (24). İlk gözlemsel çalışmalarda, FSGS hastalarının %70'inde suPAR yükselmiştir (MCD'li hastalardan önemli ölçüde daha yüksek) ve tekrarlayan FSGS'si olanlarda, olmayanlara göre nakil sonrası seviyeleri daha yüksekti (94). Bununla birlikte, sonraki birkaç çalışma, suPAR düzeylerinin böbrek fonksiyon bozukluğunun derecesine bağlı olduğunu, proteinüri derecesi ile korele olmadığını ve sadece FSGS'de değil, diğer böbrek hastalıklarında da yükseldiğini bildirmektedir (95-96).

I.G. Nefrotik Sendrom Genetiği

Nefrotik sendromda rol oynayan genlerin keşfi, glomerüler filtrasyonun moleküler mekanizmaları hakkında fikir oluşturmaya yardımcı oldu (52). Podosit ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, ocuklarda SDNS vakalarının yaklaşık %30'unda slanmıştır (26,97) ve bu monogenik kusurların tanımlanması, SDNS'nin patogenezi hakkında temel

bilgiler sağlamıştır. Önemli olarak, monogenik SDNS, özdeş nedensel mutasyonlarla bile önemli klinik ve histolojik heterojenlik sergiler ve başlangıçta idiyopatik NS'den ayırt edilemez. Bununla birlikte, monogenik SDNS'li çocuklar, böbrek transplantasyonundan sonra immünosupresyona karşı daha dirençlidir ve bu hastalarda daha düşük nüks görülmektedir (98). Bugüne kadar birçok genin her tür kalıtım modu ile SRNS ve/veya FSGS'ye neden olduğu bilinmektedir (99).

Kalıtsal bir podositopatinin saptanması, olumlu ve kötü uzun vadeli sonuçların prognostik bir göstergesidir (100) Klinik ortamlarda gen analizi için üç yaklaşım kullanılır: gen paneli, tam ekzom dizilimi (WES) ve tüm genom dizilimi (101).

I.H. Nefrotik Sendromda Klinik

Tanı, serum albümin düzeyi ve idrar tahlili gibi laboratuvar testlerinde değişiklik gerektirse de hastalar çok sayıda belirti ve semptomla başvurabilir. NS'nin 4 klasik semptomu proteinüri, hipoalbuminemi, ödem ve hiperlipidemidir (16).

Proteinüri: Bazal membran dahil endotel yüzeyi veya epitel hücreleri(podositler) gibi glomerulus bileşenlerinde hasar veya işlev bozukluğu idrardan protein (albümin ağırlıklı) kaybına yol açar. Bazal membrandaki porların boyutundaki kısıtlılık ve bariyerin sahip olduğu iyon yükü nedeniyle, idrar yoluyla sadece belirli proteinlerin(albümin, transferrin, immunglobulinler, vitamin D bağlayıcı protein gibi hormon bağlayıcı proteinler) kaybı olur (28).

Hipoalbuminemi: Proteinüri hipoalbuminemiye yola açar ve bunun sonucunda plazma onkotik basınç düşer ve interstisyuma sıvı geçişi olur (102).

Ödem: NS'nin tanısında, hastalarda, artan glomerüler geçirgenlik ve hipoalbuminemiden ve buna karşılık gelen onkotik basıncındaki azalmadan kaynaklanan ani başlangıçlı periferik, yerçekimine bağlı ödem görülür (16,103). İdrarda albümin kaybı nedeniyle onkotik basınç düşer ve böylece

dolaşım hacmi azalır. Bu hacim değişikliği, jukstaglomerüler aparat tarafından algılanır ve sodyum ve sıvı tutulmasına yol açan renin-anjiyotensin sistemini uyarır. Nefrotik sendromlu hastalarda, distal nefronda sodyum salgılama yetersizliği vardır, bu da ödem ve hipertansiyona yol açar (21). Periorbital ödem sabahları daha sık görülür ve gün boyunca kollarda ve bacaklarda daha belirgin hale gelir ve labiyal/skrotal ödem de içerebilir (16). şiddetli vakalarda anazarka mevcut olabilir ve asit, pulmoner ödem veya plevral efüzyon gibi komplikasyonlara yol açabilir (102). Bu meydana gelirse, hastada solunum sıkıntısı, soğuk ekstremiteler ve ileus ve hipoperfüzyon kaynaklı karın ağrısı gelişebilir (102). Onkotik basınç azalmasından kaynaklanan intravasküler hacim azalması da oligüri ve akut böbrek hasarına yol açabilir.

Hiperlipidemi ve Hiperlipoproteinemi: Nefrotik sendromdaki dislipidemi mekanizması karmaşıktır ve çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleşir. Hastalarda sıklıkla lipoprotein lipaz aktivatörlerinde kayıp, hatalı çalışan ankorlar ve azalmış hepatik lipaz aktivitesi görülür. Genel olarak, bu süreç, LDL kolesterol (düşük yoğunluklu kolesterol) üretiminin artmasına ve LDL kolesterol ve trigliseritlerin yıkılmasının azalmasına yol açar. Bu değişmiş lipidler sadece kardiyovasküler komplikasyon riskini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda böbrek fonksiyonunu da bozabilir (1,104).

Karın ağrısının varlığı, nefrotik sendromun bilinen ve ciddi bir komplikasyonu olan spontan bakteriyel peritoniti dışlamak için daha fazla araştırmayı tetiklemelidir. Genel olarak, NS'li ocuklar, T hücre disfonksiyonu ve idrarda immünoglobulin kaybı nedeniyle peritonit, sepsis ve pnömoni gibi ciddi bakteriyel enfeksiyonlar açısından yüksek risk altındadır. Enfeksiyon, NS'li çocuklarda morbiditenin ve tarihsel olarak mortalitenin önde gelen nedenidir (13).

I.I. Nefrotik Sendrom Komplikasyonları

NS'nin tam olarak anlaşılmayan karmaşık patogenezi göz önüne alındığında, komplikasyonlar çok sayıda ve çeşitlidir ve enfeksiyonlar, elektrolit anormallikleri, akut böbrek hasarı ve trombozu içerir (105).

Enfeksiyöz Komplikasyonlar: NS'li hastalar bakteriyel ve viral enfeksiyonlar için daha yüksek risk altındadır. Enfeksiyonlara karşı artan yatkınlık, esas olarak immünoglobulinler, kompleman ve properdinin idrar yoluyla kayıpları nedeniyle oluşur (106). Enfeksiyonlar KNS'li çocuklarda birinci ölüm nedenidir (107). Düşük serum albümini (<15 g/L veya 1,5 g/dL), artmış peritonit riski ile ilişkilidir (108).

Tromboembolik Komplikasyonlar: Tromboembolizm, NS'li çocuklarda görülen nadir fakat yaşamı tehdit eden veya organı tehdit eden bir komplikasyondur (30,109). Tromboz çoğunlukla venlerde, nadiren arterlerde görülür. NS'li hastalarda herhangi bir damarda tromboz meydana gelebilir, ancak en yaygın bölgeler bacak derin venleri, renal ven ve pulmoner arterdir (110-112).

Kardiyovasküler Hastalıklar: Uzun süreli NS hastalarında hiperlipidemi, steroid tedavisi, hipertansiyon, oksidatif stres, hiperkoagülabilité ve anemiye bağlı olarak kardiyovasküler hastalık riski artmıştır (113). Çocuklarda tedavinin gerekliliği tartışmalıdır, erişkinlerde ise HMG-CoA redüktaz inhibitörleri kullanılmaktadır.

Akut Böbrek Hasarı: AKI, hastanede NS ile tedavi edilen çocuklarda üçüncü en önemli komplikasyon olarak kabul edilmektedir (114). Yakın zamanda ABD'de yapılan çok merkezli bir çalışma, NS nedeniyle hastaneye yatırılan 336 çocuğun %58,6'sında eşlik eden enfeksiyonlar, nefrotoksik ilaç kullanımı ve SRNS gibi tanımlanmış risk faktörleriyle birlikte AKI kanıtına sahip olduğunu bildirdi (114).

Diğer Komplikasyonlar: Kemik dansitesinde azalma riski; steroid kullanımı, Vitamin D bağlayan proteinin idrarla kaybına bağlı Vitamin D eksikliği, sekonder hiperparatiroidizm, kalsiyumun azalmış intestinal absorpsiyonu nedeni ile artmaktadır (115). Büyüme geriliği iştahsızlık, idrarla

artmış protein kaybı, barsak mukoza ödemi nedeni ile oluşan malabsorbsiyon sonucunda görülmektedir (115).

I.J. Nefrotik Sendromda Laboratuvar

NS'de laboratuvar değerlendirme; NS'nin tanısı, şiddetinin belirlenmesi, olası etyolojik etkenlerin tespiti, renal biyopsi ile kesin histolojik tanının konması için yapılmaktadır.

İdrar Testleri: Proteinüri hastaların klinik takibinde ve tedaviye yanıtı değerlendirmede en önemli parametrelerden biridir. En sık kullanılan proteinüri tarama metodu idrar dipstick testidir. Dipstick testi esas olarak albümini saptar. Diğer protein türlerini saptamada yetersizdir (düşük molekül ağırlıklı proteinler, Bence Jones proteini, gama globülin). İdrardaki protein miktarına göre dipstickte renk değişikliği gözlenir (116).

Proteinüri negatif, eser (10-20 mg/dl), 1+ (30 mg/dl), 2+ (100 mg/dl), 3+ (300 mg/dl), 4+ (1000-2000 mg/dl) olarak sonuçlanır. İdrarın seyreltik olması (idrar dansitesi<1005) ya da baskın olan proteinin albümin olmaması yanlış negatif sonuca neden olabilir. Makroskopik hematüri, pyüri, bakteriüri, dansitesi yüksek idrar, antiseptik ajanlar (klorheksidin, benzalkonium klorid) ile kontamine idrar, alkali idrar, fenazopiridin tedavisi yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir (116).

Küçük çocuklarda 24 saatlik idrar toplamak zor olduğundan proteinürinin niceliksel ölçümünde spot idrar proteininin kreatinine oranı kullanılır (mg/mg/kreatinin). Bu ölçümün sabah ilk idrar örneğinde bakılması önerilmekte ve bu şekilde postural proteinüri ihtimali dışlanmaktadır. Spot idrarda proteinin kreatinine oranı 2 yaş altı çocuklarda 0,5 mg/mg kreatininden, 2 yaş ve üzeri çocuklarda ise 0,2 mg/mg kreatininden küçük olmalıdır. Sağlıklı çocuklarda 24 saatlik idrarda 150 mg (≤ 4 mg/m²/sa) protein olabilir. 4-40 mg/m²/sa anormal protein atılımını gösterirken, >40 mg/m²/sa nefrotik düzeyde protein atılımını gösterir (28,117) .

Tablo -3: Normal ve nefrotik proteinüri (28,116).

Kalitatif; idrar dipstik test ile albümin tespiti • 1+ 30-100 mg/dl • 2+ 100-300 mg/dl • 3+ 300-1000 mg/dl • 4+ >1000 mg/dl
Semikantitatif; sabah idrarında protein/kreatinin oranı (mg/mg kreatinin) • 0,2'in altında normal • 0,2–2,0 hafif • 2,0'in üzerinde ağır proteinüri
Kantitatif; 24 saatlik idrar proteini • Normal: 40 mg/m²/sa • Nefritik düzey: 4–40 mg/m²/sa

- Nefrotik düzey:> 40 mg/m2/sa

Kan Testleri: Nefrotik sendromda albümin düzeyi düşüktür. Bunun nedeni ise idrarla kaybedilen miktarın sentez edilenden çok daha fazla olmasıdır. Kan albümin miktarı 0,5-2,5 g/dl arasında değişir (118). Plazmada gamma-globülin düzeyinde azalma olabilir, alfa1- globülin düzeyi normal veya düşük olabilir, alfa2 ve beta-globülin seviyesinde de artış olabilir. Serum IgM ve IgE seviyesi artarken IgG seviyesi azalır. Diğer proteinlerden fibrinojen ve β -lipoproteinler artar ve antitrombin III azalır (119).

Hiperlipidemi, nefrotik sendromun major bulgularından bir diğeridir. Hastaların kolesterol, VLDL ve LDL seviyelerinde yükseklik vardır. Kolesterol, trigliseritler ve lipoproteinlerin hepatik sentezi artmış, lipoprotein lipaz (LPL) aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak lipoproteinlerin katabolizması azalmıştır. Bununla birlikte LPL reseptör aktivitesinde de azalma olmuştur. Total kolesterol ve LDL artarken HDL değişmeden kalır veya düşer. Nefrotik sendromlu hastalarda kardiyovasküler ve trombotik komplikasyonları artıran lipoprotein (a) düzeyleri de artar (16).

Kan üre nitrojeni (BUN) hipovolemiye bağlı olarak yüksek saptanabilir (40 mg/dl'nin üzerinde). Yapılan bir çalışmada, biyopsi ile kanıtlanmış MLH olan hastaların %20'sinde BUN değerleri 40 mg/dl'den yüksek bulunmuştur (120). Serum elektrolitleri, genellikle normal sınırlar içindedir. Hipovolemi ve uygunsuz antidiüretik hormon sekresyonunda anormal su tutulumuna bağlı dilüsyonel sodyum düşüklüğü olabilir. Serum potasyumu, oligürik hastalarda yüksek olabilir. Serum kalsiyumu hipoproteinemiyle uyumlu olarak düşüktür (121).

Nefrotik sendromlu çocuklarda beklenenin aksine tanı anında; böbrek fonksiyonlarda bozukluk, tansiyon yüksekliği veya makroskopik hematüri varsa serum kompleman 3 (C3) düzeyine bakılması gerekir. Örneğin MLH'de C3 seviyesi normalken, lupus, şant nefriti, poststreptokokal nefrit ve MPGN'de C3 seviyeleri düşüktür. Eğer hastada C3 düzeyinde düşüklük veya

hematüri varsa, SLE nefriti için antinükleer antikor (ANA) ve anti-ds DNA çalışılmalıdır (122-123). Hemogloblin ve hematokrit, nefrotik sendromlu çocuklarda, özellikle de MLH'de, plazma hacminin azalmasının bir sonucu olarak artmış olabilir. İdrarla siderofilin ve eritropoetin (EPO) kaybına bağlı olarak anemi görülür. Trombositoz yaygındır ve trombosit sayısı 500.000 ile 1 milyon/mikroL'ye ulaşabilir. Hemokonsantrasyon ve trombositoz; hiperkoagulabilite ve trombotik komplikasyonlara katkıda bulunabilir (124).

Ultrasonografi: Normal veya yüksek ekojeniteye sahip normal veya büyümüş böbreklerin tespiti, asit ve plevral efüzyonların tespitinde faydalı. Ayrıca renal ven trombozunun dışlanması için kullanılır (boyut farkı ve Doppler ultrason muayenesi)(125) .

Böbrek Biyopsisi: Çocukluk çağı nefrotik sendromlu hastaların çoğunluğunda yaş, klinik ve laboratuvar bulgular MLH'yi düşündürüyorsa bu hastalara biyopsi yapmadan steroid tedavisi verilebilir. Çünkü bu çocukların %80'den fazlası steroid tedavisine çok iyi yanıt vererek tam remisyona girer. Bu hastaların takiplerinde relaps olsa bile biyopsi yapılmadan da steroid ile tedavi edilebilirler (126). Çocuklarda böbrek biyopsisi için endikasyonlar şu şekildedir;

- **Yaş:** Hasta bir yaş altı ve on yaş üstü ise biyopsi yapılmalıdır (125).
- **Kompleman Düşüklüğü:** Akut poststreptokoksik glomerülofrit (APSGN), MPGN, SLE genellikle kompleman düşüklüğü ile seyrettiği için bu hastaların renal patolojileri biyopsi ile gösterilmelidir (16).
- **Steroide Cevapsızlık:** Hastalara 60 mg/m²/gün prednizolon 4–8 hafta verildikten sonra bakılan idrarda protein atılımı devam ediyorsa steroide cevapsız kabul edilir (16).
- **Sistemik Tutulum:** Nefrotik Sendrom kliniği ile beraber sistemik organ tutulum bulguları (raş, artralji) olması, sekonder

NS nedeni olabileceğinden böbrek biyopsisi ile tanı doğrulanmalıdır (24) .

- **Makroskopik Hematüri:** NS'de makroskopik hematüri ve glomerüler filtrasyon hızı (GFR) düşüklüğü çok beklenen bulgular değildir. Bu yüzden hastada GFR düşüklüğü veya makroskopik hematüri varsa biyopsi yapılmalıdır (125) .
- **Diğer Nedenler:** Anormal seroloji sonucunda, ciddi persistan böbrek yetersizliği gelişmişse ve nefrotoksik olan siklosporin ve takrolimus gibi kalsinörin inhibitörleri başlanmadan önce renal biyopsi yapılmalıdır (127).

I.K. Nefrotik Sendromda Tedavi

Hastalara hastalık tanısı ilk konulduğunda, sodyum ve sıvı kısıtlamasına ek olarak kortikosteroidler, albümin ve diüretikler ile alevlenmeler agresif bir şekilde tedavi edilir. Steroide dirençli hastalık durumunda veya kortikosteroidlere yan etki gelişen hastalarda, steroidden koruyucu tedaviler kullanabilir ve konservatif olarak tedavi edilmeleri gerekebilir (128).

I.K.a. Steroid-Sensitif Nefrotik Sendromda Tedavi

Nefrotik sendrom için ilk temel tedavi steroidlerdir. NS'li çocukların çoğu (%80-%90) steroid tedavisine yanıt verecektir (64,98). Çocuklar, iki ay veya daha fazla sürede remisyona ulaşan yetişkinlere kıyasla, steroidlerle sıklıkla 4 hafta içinde remisyona ulaşırlar (25). Çocuklarda ve yetişkinlerde nüks insidansı yüksektir. Çoklu etki mekanizmalarının bu ilaçların etkinliğine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Kortikosteroidler, glukokortikoid reseptöründe gen ekspresyonunu modüle ederek, anti-inflamatuvar sitokinleri artırır ve proinflamatuvar sitokinleri azaltır. Ayrıca T hücre fonksiyonunu da baskılayabilirler (97). Bununla birlikte, kortikosteroidlerin en uygun etkisi, podositler üzerindeki etkileridir. Kortikosteroidler, idrar yoluyla protein kaybını

azaltan podosit şeklindeki ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesindeki değişiklikleri stabilize edebilir veya tersine çevirebilir. KDIGO (böbrek hastalığı küresel sonuçlarının iyileştirilmesi) yönergeleri, Tablo 4’te listelenen kortikosteroidler için özel dozlama önerilerini tanımlar (99). Dozlama için kullanılan birimlere özel dikkat gösterilmelidir. Prednizon veya prednizolonun sabahları günde bir kez uygulanması tercih edilir, çünkü bu adrenal kortikosteroidlerin günlük endojen salınım modellerini taklit eder.

Başlangıç prednizon tedavisi 4-6 hafta boyunca günlük 60 mg/m² (veya 2 mg/kg) (maksimum doz, 60 mg/gün) veya 40 mg/m²(veya 1,5 mg/kg) şeklindedir (ilk 2-5 aylık dozu). Dozu sonraki dört hafta boyunca her hafta 5 mg/m² ila 10 mg/m² olacak şekilde azaltılmalı, ardından minimum 12 haftada kesilmelidir (100). (Tablo-4).

Tablo-4: KDIGO yönergelerinde kortikosteroid dozu (99).

Tablo	Öneri
Steroide duyarlı nefrotik sendromun başlangıç tedavisi	-Oral prednizon veya prednizolon 60 mg/m²/gün veya 2 mg/kg/gün tek doz olarak (maksimum: 60 mg/gün) 4-6 hafta -Ardından, 4-6 hafta boyunca günde bir oral prednizon veya prednizolon 40 mg/m²/gün veya 1,5 mg/kg tek doz olarak (gün aşırı maksimum: 40 mg/gün) -Sonra, 2-5 ay boyunca azaltılır -Toplam süre: en az 12 hafta
Steroide duyarlı nefrotik sendromun seyrek nüksleri	-Oral prednizon veya prednizolon 60 mg/m²/gün veya 2 mg/kg/gün tek doz olarak (maksimum: 60 mg/gün) çocuk 3 gün boyunca tam remisyona girene kadar -Ardından, en az 4 hafta boyunca günde bir oral prednizon veya prednizolon 40 mg/m²/gün veya 1,5 mg/kg tek doz olarak (en fazla: gün aşırı 40 mg/gün) -Sonra, azaltılır
Sık relapslar veya steroide bağımlı veya steroide duyarlı nefrotik sendrom	-Çocuk en az 3 gün remisyonda olana kadar günlük prednizon -Daha sonra, majör yan etkiler olmaksızın remisyonu sürdürmek için en düşük doz kullanılarak en az 3 ay boyunca gün aşırı prednizon

	-Alternatif gün tedavisi etkili değilse günlük prednizon kullanılabilir - Azaltmadan önce 3-6 ay boyunca tedavi devamı gerektirebilir
--	--

Albumin: Albümin ve diüretikler ödem tedavisi için birlikte verilir. Albümin, vasküler yataktaki onkotik basıncı arttırmak için verilir, bu nedenle ozmotik gradyanı artırır. Periferik dokulardan ve interstisyumdan intravasküler kompartmana su geçişi olur (128).

Diüretikler: Loop diüretikleri, etkilerini sodyumun yaklaşık %15-25'inin emiliminden sorumlu olan Henle Kulbunun çıkan koluna etki ederek gösterir (128). Loop diüretikleri, sodyum ve klorürün kan dolaşımına yeniden emilimini engelleyen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransporterini bloke ederek etkilerini gösterirler (128). Daha sonra bu sodyumu su izler ve net etki idrarda su ve elektrolit atılımını artırır (13). Amilorid, toplama kanalındaki sodyum-potasyum iyon değişimini engelleyerek çalışan potasyum tutucu bir diüretiktir (128). Bu, sodyum rezorpsiyonunun azalmasına ve dolayısıyla sodyum ve su atılımının artmasına neden olur (128). Amilorid ayrıca epitelyal sodyum kanalının aktivasyonunu da bloke eder (24).

I.K.b. Steroid-Dirençli Nefrotik Sendromda Tedavi

KDIGO kılavuzları, sık relaps görülen ve steroide bağımlı hastalığı olan hastalar için steroidden koruyucu tedaviler olarak alkilleyici ajanlar siklofosfamid ve klorambusilin kullanılmasını özellikle tavsiye eder (129). Bu ajanların kullanımı kortikosteroidler olmadan nüks riskini azaltabilir ve remisyon > bir yıl uzatabilir (103). Bu ilaçlar, alkilasyon yoluyla DNA sentezini inhibe ederek ve DNA ipliklerini çapraz bağlayarak, glomerüler membran geçirgenliğine katkıda bulunan immünolojik hücrelerin apoptozisine yol açarak çalışırlar (103).

Siklofosfamid, karaciğerde aktif forma dönüştürülen bir ön ilaçtır ve daha yaygın olarak kullanılan alkilleyici ajandır (130). Siklofosfamidin faydası,

tedavinin uzunluğu ile ilişkilidir ve optimal tedavi 8-12 haftadır. Bu fayda, özellikle hemorajik sistit gibi bazı potansiyel olarak ciddi yan etkilerle dengelenmelidir. (128).

Klorambusil, daha fazla yan etki ile ilişkili olduğundan daha az kullanılır, ancak siklofosfamide alternatif olarak kullanılabilir.

Pediyatrik NS'de koruyucu tedaviler olarak kullanılabilecek başka bir ilaç sınıfı, kalsinörin inhibitörleri siklosporin ve takrolimustur. Siklosporin renal arter vazokonstriksiyonuna neden olur ve glomerüler geçirgenliği azaltır, podosit hücre iskeletini stabilize eder ve idrara daha az protein geçmesine neden olur (103) (tablo-5). Takrolimus, MCD'li hastalarda görülen masif proteinüriye katkıda bulunan vasküler geçirgenlik faktörünü azalttığı düşünülen başka bir kalsinörin inhibitörüdür (128).

Mikofenolat, NS için steroidden koruyucu bir tedavi olarak kullanılabilecek başka bir ajandır (131). Mikofenolat bir pürin sentetaz inhibitörüdür ve NS'de yararlıdır, çünkü glomerüldeki bir hücre tipi olan ve renal korpüskülün bazal membranından proteinin çıkarılmasında rol oynayan mesangiyal hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder (128).

Rituximab, B hücreleri üzerindeki CD20 yüzey antijenine karşı aktiviteye sahip olan, B hücrelerini tüketen kimerik bir antikordur (131). Tedavideki rolü halen tanımlanmakla birlikte, rituksimab hem steroidde duyarlı hem de steroidde dirençli hastalıkta kullanılabilir (24).

Tablo-5: Farmakoterapi dozlaması ve yan etkileri (97).

İlaç tedavisi	Doz	Yan etki
Prednizon Prednizolon	Tablo-4	Hipotalamik-hipofiz aksın baskılanması, kilo alımı, kalsiyum kaybı, kemik mineral yoğunluğunda azalma, hiperglisemi, diyabetes mellitus,

		büyüme bozukluğu/gecikmesi
Albümin	0,5-1 g/kg	Anafilaksi, aşırı duyarlılık reaksiyonları, ateş, dehidratasyonun alevlenmesi, intraventriküler kanama (yeni doğanlar)
Furosemid	IV:6-12 saatte bir 0,5-2 mg/kg doz	Fazla miktarda verilirse aşırı diürez ve elektrolit imbalansı
Amilorid	0.625 mg/kg/gün her 12-24 saatte bir	Hiperkalemi
Siklofosfamid	8-12 hafta boyunca 2 mg/kg/gün (maksimum kümülatif doz: 168 mg/kg)	Kemik iliği baskılanması, alopesi, hemorajik sistit, enfeksiyon, gonadal disfonksiyon/infertilite, hiponatremi, SIAD, hipokalsemi
Klorambusil	8 hafta boyunca 0,1-0,2 mg/kg/gün (maksimum kümülatif doz: 11,2 mg/kg)	Kemik iliği baskılanması ve kanserojen/teratojenite/infertilite
Siklosporin	4-5 mg/kg/gün ikiye bölünmüş dozlarda	Ciddi enfeksiyon, neoplazm, hipertansiyon ve nefrotoksisite Dişeti hiperplazisi, hirsutizm, diabetes mellitus, hiperkalemi, hipomagnezemi, nörotoksisite
Takrolimus	2 bölünmüş dozda 0,1 mg/kg/gün	Ciddi enfeksiyon ve neoplazm, Hipertansiyon, renal disfonksiyon, diabetes mellitus, hiperkalemi, hipomagnezemi, nefrotoksisite, nörotoksisite
Mikofenolat Mofetil	1200 mg/m ² /gün 2 bölünmüş dozda 12 ay	Ciddi enfeksiyon, malignite, embriyo-fetal toksisite, Lökopeni,

	süreyle verilir	karın ağrısı, ishal
Rituksimab	4 haftalık doza kadar doz başına 375 mg/m ²	İnfüzyon reaksiyonları, mukokutanöz reaksiyonlar, hepatit B reaktivasyonu ve progresif multifokal lökoensefalopati, Pulmoner toksisite, kemik iliği baskılanması

¹SIAD: Uygunsuz antidiürez sendromu.

I.L. Deneysel Nefrotik Sendrom

Kemirgen modelleri, NS'yi in vivo olarak simüle etmek ve tedaviye yanıtı incelemek için gerekli araçlardır. Nefrotik sendromun deneysel modeli, adriamisin(doksorubisin) (132,136) ve/veya puromisin aminonükleozit (133) tarafından indüklenebilir.

NS çalışması için birkaç hayvan modeli olmasına rağmen, Adriamisin uygulamasının neden olduğu hastalık birçok çalışmada çok sık kullanılmıştır (134). Sıçanlarda ve farelerde adriamisin, enjeksiyondan sonra plazmadan hızla dokulara geçer ve dokularda birikir. İlaç esas olarak safrayla ve idrarla atılır (134). Adriamisin böbrek, karaciğer, kalp ve bağırsakta yoğun bir şekilde birikir. Beş ila yirmi mg/kg intravenöz dozlarda verilir, 10 saatlik bir süre içinde yaklaşık %34'ü safrayla ve %6-8'i idrarla atılır (134).

Anti neoplastik ajan olan adriamisin, fokal segmental glomerülonefritli hastalarda tarif edilenlere benzer şekilde kemirgenlerde renal hasara neden olur (135). Adriamisin progresif glomerüler hastalığa neden olarak 4 - 6 hafta içinde hafif derecede renal yetmezlikle seyreden nefrotik sendrom tablosu oluşturmaktadır (132). Uzun süreli proteinüri tablosunun devam etmesi ile 12 - 16. haftalarda FSGS tablosu oluşumuna yol açar (136). NS ve tedavisi için kullanılan ajanların böbrek üzerindeki uzun vadeli etkilerini ortaya koymak için ideal bir model oluşturur (137). Bertani (132) ve ark. 7,5 mg/kg tek doz intravenöz adriamisin vererek sıçanlarda nefrotik sendrom oluşturmuş deney

bitiminde hem biyokimyasal parametreleri, hem de böbrekten alınan parçaların histopatolojisini incelemişlerdir. Bu çalışmalarda adriamisin verdikten 4- 5 gün sonra proteinürinin başladığını, tam NS'nin 15. günde, patolojik bulguların ise 28. günde MDH ile uyumlu olarak ortaya çıktığını göstermişlerdir. Okuda (138) ve arkadaşları kronik progresif glomerüler hastalık oluşturmak için adriamisini kullanmışlar ve benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Nefrotik sendrom modelinin sadece adriamisinin intravenöz verilmesiyle değil aynı zamanda 5 mg/kg tek doz intraperitoneal adriamisin enjeksiyonundan sonra da nefrotik sendrom oluşturulabildiği gösterilmiştir (139). Daha önce yapılan farklı çalışmalarda 10 mg/kg intraperitoneal adriamisin tek doz, verilen tüm sıçanlarda deneysel nefrotik sendrom oluşturduğu gösterilmiştir (132,139). Adriamisin ile heparan sülfatın elektriksel yoğunluğunda ve glomerüler kapiller duvarda epitelyal membran sialik asitte meydana gelen azalma ile glomerüler elektriksel seçicilikte bozulma sonrası proteinüri meydana gelir (140-141). Bu modeldeki proteinürinin hacim bariyerindeki kayba bağlı olduğu çoğunluk tarafından kabul edilmekle beraber morfolojik incelemelerde heparan sülfatta azalma olmaksızın epitelyal ayrışmanın olması dikkat çekmektedir (141). Ayrıca oksijen radikallerinin de proteinüriden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (140). Jeansson ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada (142), adriamisinin proteoglikan sentezini azaltarak glomerüler glikokaliksi incelttiği, glomerüler bazal membranı etkilemediği ancak endotelyal yüzey kalınlığını azaltarak glomerüler yükü ve büyüklüğe bağlı selektiviteyi değiştirdiğini göstermişlerdi.

I.M. Nefrotik Sendromda Prognoz

Minimal değişiklik patolojisi olan hastalar için prognoz çok iyidir ve çoğu hasta kortikosteroid tedavisini takiben remisyona girer. Hastaların %85 ila 90'ı steroide duyarlıdır ve nüks ederek onları steroid toksisitesi, sistemik enfeksiyonlar ve diğer komplikasyonlar açısından risk altına sokabilir (14).

Fokal segmental glomerülosklerozlu hastalar için prognoz ciddidir. Genellikle diyaliz ve böbrek nakli gerektiren son dönem böbrek hastalığına ilerleyecektir.

II.Apoptozis ve Anti-Apoptotik Proteinler

II.A.a. Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü)

Apoptoz kelimesi ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972'de yayınlanan bir makalede morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü tipini tanımlamak için kullanılmıştır (143). Apoptoz, inflamatuvar bir yanıt ortaya çıkarmadan hücre sel parçalanmaya yol açan programlanmış hücre ölümünün aktif bir şeklidir (144-146). Bir dizi enzime bağlı biyokimyasal süreçle birlikte hücre yapısında bir dizi karakteristik morfolojik değişiklik ile karakterize edilir. Sonuç, çevredeki dokulara minimum hasar ile hücrelerin vücuttan temizlenmesidir (147).

Fizyolojik hücre ölümü çoğu durumda nekrozun aksine apoptozla gerçekleşir (148). Apoptozis normal olarak gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücrelerin devamını sağlamak için bir homeostatik mekanizma olarak oluşmasının yanı sıra, hastalık durumunda ya da zararlı ajanlar tarafından hücreler zarar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak da oluşabilir (149). Kanser tedavisinde kullanılan radyoterapi veya kemoterapide kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarına neden olur ve bu da p53'e bağlı bir yolla apoptotik ölüme yol açabilir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, bazı hücrelerde (örn. Timositler) apoptotik ölüme yol açabilirken diğer hücreler etkilenmezler (149). Son olarak, apoptoz, "kaspazlar" adı verilen bir grup sistein proteazın aktivasyonu ile hücrenin nihai ölümüne yol açan karmaşık olaylar dizisini içeren koordineli ve genellikle enerjiye bağımlı bir süreçtir (149).

Bozulmuş apoptoz, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, bakteriyel ve viral hastalıklar, kalp hastalıkları ve kanser dahil olmak üzere birçok hastalık türü ile ilişkilidir (150). Birçok otoimmün hastalık, sistemik lupus eritematosus (SLE), bağ dokusu hastalığı ve romatoid artrit (RA) gibi apoptotik hücrelerin bozulmuş klirensinin sonuçlarıdır (150). Bağışıklık

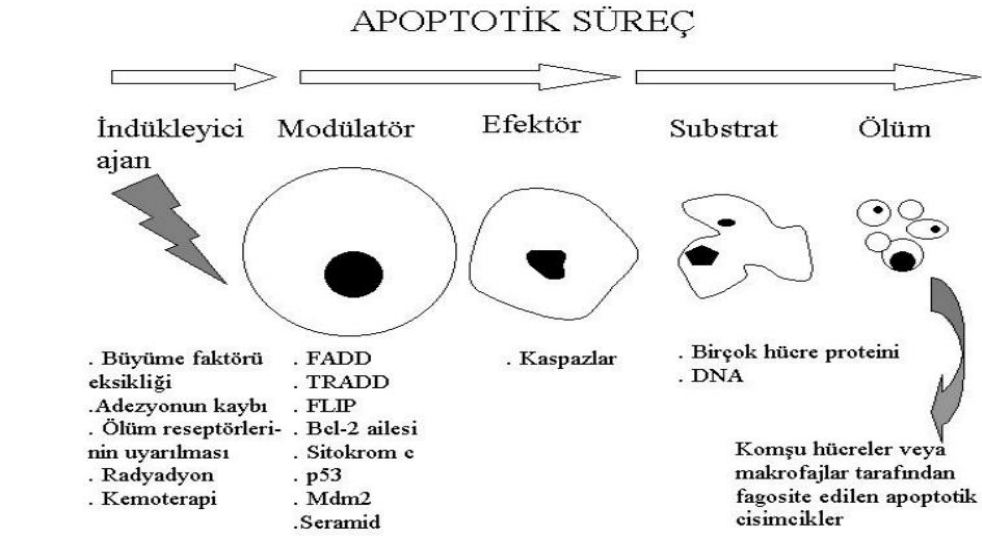
hücrelerinin kusurlu apoptozu ayrıca multipl skleroz ve otoimmün lenfoproliferatif sendromlar gibi otoimmün hastalıklara da neden olabilir (151). Tipik olarak, hatalı çalışan Fas/FasL apoptotik yolu, lenfositlerin normal apoptozisine müdahale ederek lenfosit fazlalığına yol açar ve bu da otoimmüniteye yol açar (150).

II.A.a.a. Apoptozun Gerçekleşme Aşamaları ve Moleküler Mekanizması

Apoptozun biyolojik mekanizması son derece karmaşıktır. Apoptozun eksiksiz uygulaması, çok çeşitli proteinlerin ve sinyal dönüştürücülerinin etkileşiminin yanı sıra sinyal yollarının kademeli olarak etkileşimini içerir. İki ana apoptoz yolu vardır. Bunlar şekil-2 de görüldüğü gibi ekstrinsek veya ölüm reseptör yolu ve intrinsek veya mitokondriyal yoldur (145). İkisi de kaspazları, sistein aspartil proteazları aktifler ve mitokondri membran geçirgenlik artışı, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu ve sonuçta hücre yıkımına neden olur (8).

Apoptoz, şekil-2 de görüldüğü gibi belirli uyarılarla başlatılan moleküler olayların enerjiye bağımlı döngüsünün son noktasıdır ve dört ardışık basamağı vardır (152). Bunlar:

1. Ekstra ve intraselüler sinyallerle apoptozun başlatılma fazı.
2. Kontrol ve düzenlenme fazı: İntraselüler pozitif ve negatif düzenleyici moleküllerle apoptozun stimülasyonu veya inhibisyonu söz konusudur.
3. İnfaz fazı: Genel final fazı ve fiili ölüm programından oluşur ve bu faz çoğunlukla proteazların kaspaz ailesi tarafından gerçekleştirilir.
4. Fagositoz fazı: Fagositoz ile ölü hücrelerin temizlenmesidir.



Şekil-2: Apoptotik sürecin gösterimi (8).

TRADD: TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı, **FADD:** Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini, **Bcl-2:** B hücreli lenfoma-2.

II.A.a.b. Apoptoz Morfolojisi

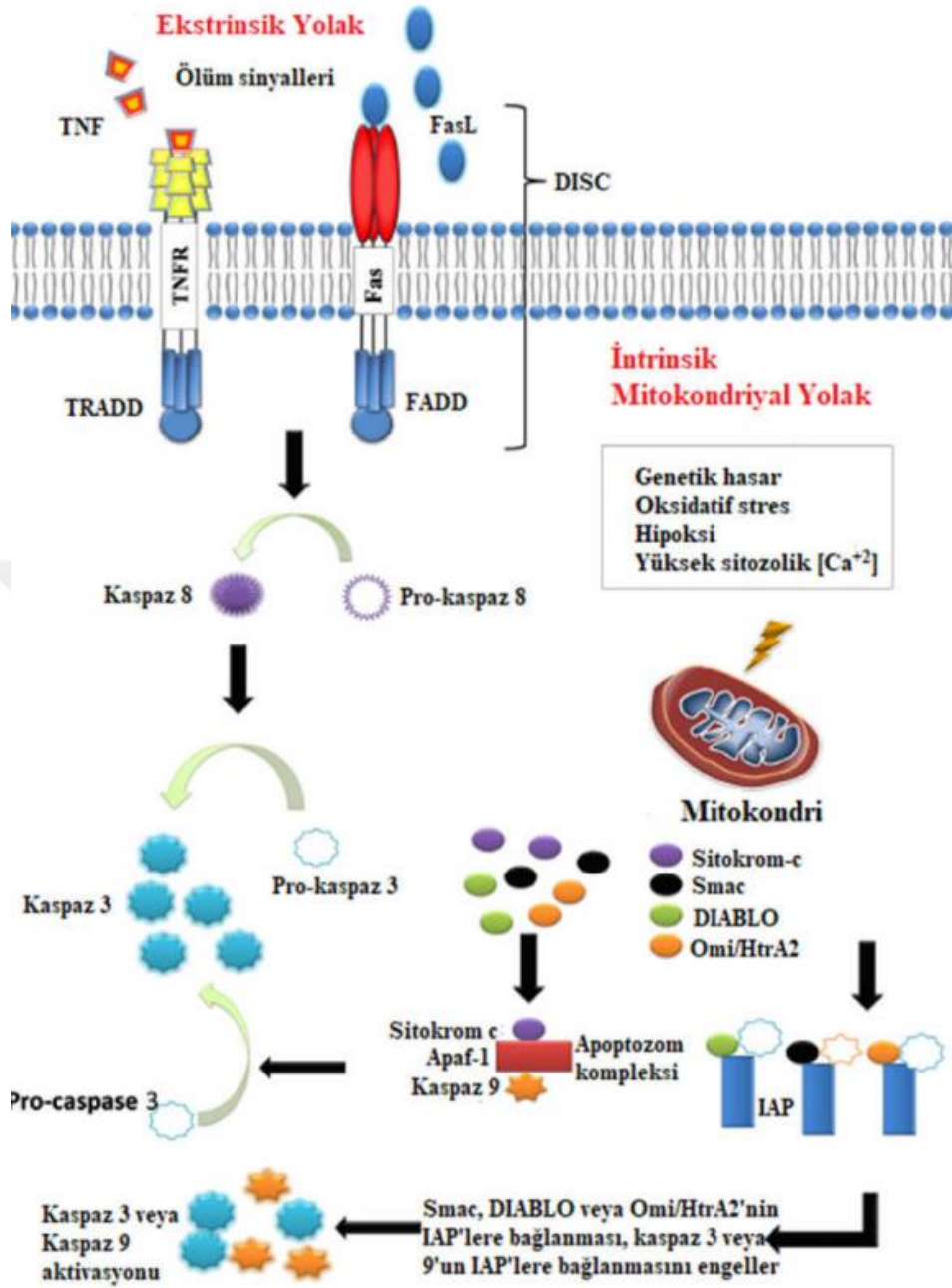
Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen değişiklikler ışık ve elektron mikroskobu ile tanımlanmıştır (153). Erken apoptoz sürecinde, hücre küçülür, sitoplazma yoğunlaşır, organeller daha sıkı paketlenir ve piknoz ışık mikroskobu ile görülebilir (143,154). Apoptozun en karakteristik özelliği kromatin yoğunlaşması olan piknozdur(155). Apoptotik hücre, koyu renkli eozinofilik sitoplazmalı ve yoğun mor nüklear kromatin parçacıklı yuvarlak veya oval bir kitle olarak görünür (154).

II.A.a.c. Apoptoz Mekanizması

Yapılan araştırmalar ışığında ekstrinsik veya ölüm reseptör yolu ve intrinsik veya mitokondriyal yol olmak üzere iki ana apoptotik yol olduğu bilinmektedir. Her iki yol birbiri ile bağlantılıdır ve bir yoldaki moleküller diğer

yoldaki molekülleri etkileyebilir (156). T-hücre aracılı sitotoksiteyi ve hücrenin perforin-granzime bağlı öldürülmesini içeren ek bir yol vardır. Ekstrinsik, intrinsik ve perforin-granzim yolları aynı terminalde veya yürütme yolunda birleşir.

Apoptoz, hücre içi bir dizi sensör aracılığıyla hasarı tespit ettiğinde; intrensek yol olarak bilinen bir mekanizma ile hücrenin kendisi tarafından başlatılabilir. Alternatif olarak, bağışıklık sisteminin bir hücresi ile apoptozun intrensek yolu olarak bilinen hasarlı bir hücre arasındaki etkileşimden kaynaklanabilir (145,157). İnsan vücudunda günde yaklaşık 1×10^9 hücrenin apoptoza uğradığı tahmin edilmektedir (158). Apoptozun hem intrensek hem de extrensek yolları, çok hücreli organizmaların sağlıklı kalmasını ve kusurlu hücrelerin vücuttan atılmasını sağlamak için sinerjik olarak çalışır. Apoptozun düzenlenememesi birçok hastalıkta sergilenen patolojilere neden olabilir. Örneğin, nöronal ölümün kaspazların aktivasyonu ile başlatıldığı görülen Alzheimer gibi dejeneratif hastalıklarda, apoptozda önemli bir enzim grubu yer alır (159). Ancak apoptozun başarısız olması ve bunun sonucunda vücutta hasarlı hücrelerin birikmesi, çeşitli kanser türlerine neden olabilir.



Şekil-3: Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolları (160).

APAF-1: apoptotik proteaz aktive edici faktör 1, **IAP:** inhibitör apoptoz protein, **TNF-a,** tümör nekroz faktörü alfa; **TNFR1,** tümör nekroz faktörü reseptörü 1, **TRADD:** TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı, **FADD:** Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini, **DISC:** ölüme neden olan sinyal kompleksi.

Ekstrinsik Apoptotik Yolak

Extrinsik yol, apoptozun reseptör aracılı başlatılmasına karşılık gelir. Extrinsik yoldaki ölüm reseptörlerinin tümü, transmembran bölgeleriyle hücre zarına sabitlenir. Hücre dışı bir ligand ile etkileşim üzerine, zar reseptörleri, ölüm sinyallerini sitoplazmik ölüm alanları aracılığıyla hücre içi boşluğa iletir (150). Apoptozda yer alan membran reseptörleri, aktivasyonu iki ana liganda bağlı olan tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesine aittir. Şekil-3 de görüldüğü gibi TNF ve Fas reseptörleri, yani TNFR-1, TNFR-2 ve Fas büyük bir apoptoz yolu olan TNF yolunu başlatmaktan sorumludur. TNF ve reseptörleri arasındaki etkileşimin, iki adaptör proteinin alınması yoluyla ölüm sinyalini ilettiği gösterilmiştir. TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini (FADD) ve eylem yoluyla programlanmış hücre ölümü kaspazların etkisi ile aktiflenir. TNF ligandları, zar üzerindeki TNF reseptörlerine bağlanan homotrimerleri oluşturur. Bağlanma üzerine, adaptör proteinler (TRADD, FADD ve RIP), adaptör proteinlerdeki ölüm alanlarının reseptörler üzerindeki benzerleriyle etkileşime girdiği sitoplazmik taraftaki TNF reseptörlerine alınır. FADD, bu durumda, ölüm efektör alanlarının (DED) homotipik etkileşimi yoluyla procaspaz-8'i toplar. Procaspase-8 daha sonra hücre ölümünün yürütme aşamasını başlatan aktif kaspaz-8'i vermek üzere otomatik bölünmeye uğrar. Kaspaz-8, çeşitli hücre içi proteinlerin proteolitik bozulmasının nihai uygulamasından sorumlu aktif kaspaz-3'ü üretmek için proteolitik bölünme yoluyla prokaspaz-3'ü parçalar. Fas aracılı yol, çok benzer bir sinyalleşme sürecinden geçer. FasL (Fas ligandı), Fas reseptörlerine (CD95 olarak da bilinir) bağlanarak yolu tetikler. FADD, Fas reseptörleri ile birleşir ve kaspaz-8'i toplar. Fas reseptörleri, FADD ve procaspaz-8 ile birlikte ölüme neden olan sinyal kompleksini (DISC) oluşturur (150)(Şekil-3). Başlatıcı bir kaspaz olan ve prokaspaz-8'in aktif formu olan Kaspaz-8 diğer kaspazlar ile etkileşim kurarak apoptozu başlatır.

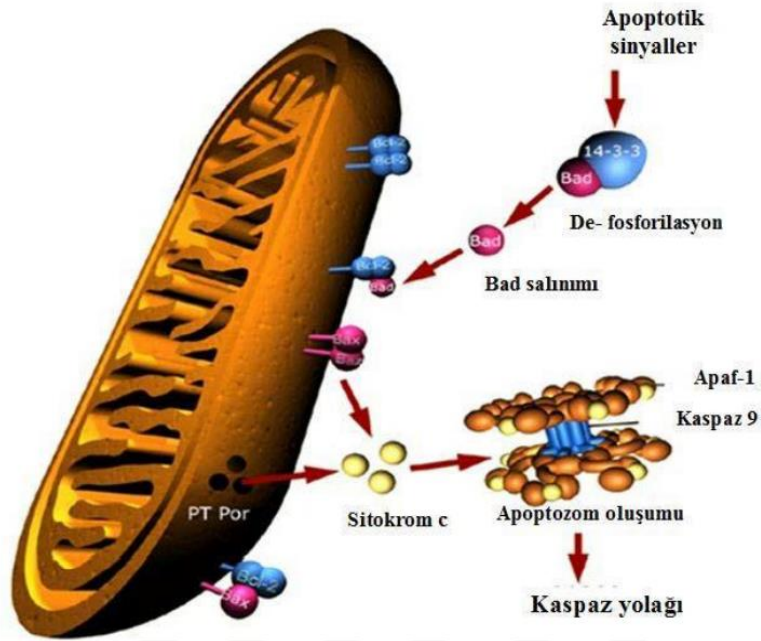
İntrinsik Mitokondriyal Yolak

Apoptozun içsel yolu, reseptör aracılı olmayan başlatma ve mitokondriyal düzenleme ile karakterize edilir (150). İçsel yolda, uyarılar

doğrudan hücre içinde biyokimyasal değişikliklere yol açan hücre içi sinyaller üretir. Bir uyarıcı mevcut olduğunda, zar potansiyelini dağıtan ve onu daha geçirgen hale getiren mitokondriyal transmembranın bozulmasına neden olur. Uyarıcı ayrıca, proapoptotik faktörleri sitozole kanallara eden dış zar üzerinde mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerinin (MPT) oluşumu ile sonuçlanır (161). Apoptozom prokaspaz-9'u bölerek aktif kaspaz-9'u verir ve bu da efektör kaspazını (yani kaspaz-3) aktive eder. SMAC'ler (kaspazların küçük mitokondri türevli aktivatörü) olarak bilinen başka bir protein grubu, sitozole salınmalarının ardından IAP'ye (apoptoz proteinlerinin inhibitörü) bağlanır (162). SMAC'ler IAP'yi devre dışı bırakarak apoptozun ilerlemesine izin verir. DIABLO ve Omi gibi diğer IAP inhibitörleri bildirilmiştir (163). Bu proteinler, apoptozun kaspaz bağımlı yoluna girer. Apoptozu indükleyen faktörler (AIF'ler) olarak bilinen ikinci bir grup protein, apoptozun kaspazdan bağımsız yolunda işlev görür (164). AIF'ler mitokondrinin iç zarına sabitlenir. Kalsiyuma bağımlı bir proteaz olan kalpain tarafından bölünme üzerine, AIF'ler, DNA fragmentasyonunu ve kromatin yoğunlaşmasını indüklemek için nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ile çekirdeğe yer değiştirebilir (165).

Adından da anlaşılacağı gibi, intrinsik yolak hücre içinde başlatılır. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonlarının aşırı yükselmesi ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyarıcılar, intrinsik mitokondriyal yolun başlamasını tetiklemektedir (149). Bu yolak uyarıcılardan bağımsız olarak mitokondri geçirgenliğinin artması ve sitokrom-c gibi proapoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınması sonucunda aktifleşir (166). Bu yolak, BCL-2 ailesine ait bir grup protein tarafından düzenlenmektedir (167). BCL-2 proteinlerinin pro-apoptotik üyeleri (örn. BAX, BAK, BAD, BCL-XS, BID, BIK, BIM ve HRK) ve anti-apoptotik üyeleri (örn. BCL-2, BCL-XL, BCL-W, BFL-1 ve MCL-1) olmak üzere iki ana grubu vardır. Anti-apoptotik üyeler, sitokrom-c'nin mitokondriyal salınımını bloke etmek suretiyle apoptozu düzenlerken, pro-apoptotik üyeler sitokrom-c'nin mitokondriyal salınımını aktive ederek apoptozu etki eder. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki denge apoptozun başlatılıp başlatılmayacağını belirler (168). Mitokondriden

sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler apoptoz indükleyici faktör (AIF), mitokondri kaynaklı ikinci kaspaz aktivatörü (Smac), DIABLO ve Omi/HtrA2'dir. (165). Sitoplazmik sitokrom-c salınımı, sitokrom-c, Apaf-1 ve Kaspaz-9'dan oluşan apoptozom kompleksinin oluşumu ile Kaspaz-3'ü aktifleştirir (169). Diğer yandan, Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2, apoptoz proteinleri inhibitörüne (IAP'ler) bağlanarak kaspaz aktivasyonunu destekler. Daha sonra Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 IAP'lerin Kaspaz-3 veya -9 ile etkileşiminin bozulmasına yol açar (169-170). Ekstrinsik ve intrinsik yolların her ikisi de Kaspaz-3'e çıkar. Kaspaz-3, nüklear apoptozda görevli kaspaz ile aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü parçalar. Hücre döngüsü, hücre iskeleti ve sinyal yolları üzerinde de etkileri olan kaspazlar, hücre iskelet proteinlerinin, protein kinazların, DNA tamir proteinlerinin ve endonükleazların inhibe edici alt birimlerinin aktivasyonuna neden olur. Böylece apoptozdaki tipik morfolojik değişiklikler meydana gelir (171).



Şekil-4. Apoptoz sırasında hücre içi sinyallerle aktifleşen mitokondriyal yol (172). **APAF-1:** apoptotik proteaz aktive edici faktör 1

II.A.a.d. Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

1972 yılında, apoptoz terimi ilk kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmiştir. Günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. aktif kaspaz 3 tayini) moleküler düzeyde belirlenebilmesiyle de apoptoz saptanabilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptoz, seksenli yılların sonlarına doğru DNA kırıklarının saptanmasına yönelik yöntemlerle saptanmaya başlamıştır. Doksanların ortasında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştigi bulunmuştur. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metotlarla apoptoz saptanmaya başlandı (89).

II.A.a.d.a. Kaspazlar

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümü ve iltihaplanmasında önemli roller oynayan 15 üyeli bir sistein proteaz ailesidir (173-174). Kaspazlar, sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunur. Fakat proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerler ve böylece kaspaz aktivasyon zinciri başlar. Kaspazlar, (cysteine-dependent aspartate-specific proteases) kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluştururlar ve latent intrasellüler proenzimler olarak sentezlenmektedirler (175). Kaspazlar aktif merkezlerinde sistein aminoasidi taşırlar ve hedefledikleri proteinleri ASP (aspartat, aspartik asit) bölgesinden keserler. Kaspazlar hücre içerisinde inaktif zimojenler olarak sentezlenirler ve prokaspaz adını alırlar. Sitokrom c'ler prokaspaz zimogenlerini aktive etmektedir. Kaspazlar apoptotik yolun cellatlarıdır ve apoptozdaki karakteristik değişikliklerin en önemli sebebidir (176). Kaspaz aktivasyonunun inhibitörleri, sitokrom c'nin mitokondriden salınımını bloke etmez ancak ardışık kaspaz aktivasyonunu bloke ederek, hücre ölümünü önler. Sitokrom c gibi apoptozu indükleyen AIF'in de mitokondriden salınımı kaspazların aktivasyonuna sebep olur (177). Başlangıçta, kaspazlar mitokondride membran hasarı oluşturur ve bu olayların sonucunda; zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlar ortaya çıkar (176). 26 Günümüze kadar 14 memeli kaspazı tespit edilmiş olup hayvanlarda bulunan kaspaz 11 ve 12'nin insandaki karşılığı hala gösterilememiştir. Kaspaz 9, bcl-

2 ailesi tarafından stimüle veya inhibe edilir. Kaspaz 2 ve kaspaz 8, TNF- α gibi sitokinler tarafından aktive edilir. Kaspazlar apoptozu aktive eden sinyaller tarafından tetiklenip, apoptoz yollarında aktif olarak görev alırlar (177).

II.A.a.d.b. Kaspazların Yapısı ve Kaspaz Türleri

Kaspazlar 3 subunit içeren prokaspazlar olarak sentezlenir. Bunlar NH2 terminal subunit, büyük subunit, ve küçük bir subunittir. Büyük ve küçük alt birimler birbirleriyle etkileşime girerek enzimin aktif merkezini oluştururlar. Her prokaspaz çeşitli uzunluklarda bir ön bölge veya NH2-terminal peptid bölgesi içermektedir ve bu ön bölgeler düzenleyici olarak görev yaparlar. Kaspazların ön bölgeleri çeşitlilik gösterir. CARD (Caspase Recruitment Domain) ve DED kaspazların ön bölgelerinin özel motifleridir ve protein-protein etkileşiminde görev alırlar. Bu bölgeler prokaspazlar ve adaptörleri arasında homofilik etkileşime aracılık ederek prokaspaz aktivasyonunda önemli rol oynarlar. DED-DED etkileşiminde hidrofobik bir bağlantı kurulur, CARD-CARD bağlantısında yük etkileşimi gözlenir. Başlatıcı kaspazların kümelenmesi ve aktivasyonu için ölüm reseptörleri ile bağlantı kuran adaptör moleküller bulunur. Bunlardan DED kaspaz 8 ve 10 etkileşiminde, CARD ise kaspaz 9 ve Apaf-1 etkileşimde görev alır (177)(2). Her bir kaspaz enziminin optimum kesme bölgesi vardır ve bu bölge aspartik kesim noktasının N-terminalinde bulunan dört aminoasitlik bir motiftir. Bu motifin görevi, kaspazın hedef proteininin seçimini belirlemektir. Ayrıca bu motif ilgili kaspazın peptid inhibitörlerle inaktive olmasına aracılık etmektir (178). Aktif kaspazların 3 boyutlu yapısı tespit edilmiş olup 2 heterodimer, 2 geniş subunit tarafından çevrelenmiş 2 komşu küçük subunitle karşı yönde bir tetramer oluşturur. Her bir heterodimer substratın bağlanması ve katalizi için gerekli küçük ve geniş subunitler içerir (177). Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu), ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, ya da kaspaz 9 bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir. Başlangıç kaspazları bir kez aktive olduğunda diğer prokaspazları aktive eder. Proteolitik olarak birbirlerini aktifleştiren kaspazlar bir kaskad şeklinde işlerler (179).

Apoptozun başlaması, kaspazlar olarak bilinen bir dizi sistein-aspartik proteazın aktivasyonuna bağlıdır. Kaspazlar başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8 ve 9), cellat kaspazlar (kaspaz 3, 6 ve 7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz 1, 4, 5, 11 ve 12) olmak üzere üç kategoriye ayrılır (145,154). Bir kaspaz bir proteolitik zincirde diğer kaspazları aktive ederek hızlı hücre ölümüne neden olur (145). Hücre hasarı tespit edildiğinde, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8 ve 9) aktif olmayan prokaspazlardan aktive edilir ve cellat kaspazlarını (kaspaz 3, 6 ve 7) aktive etmeye devam eder. Cellat kaspazlarının aktivasyonu, endonükleazların aktivasyonundan DNA parçalanması, nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin yok edilmesi, proteinlerin çapraz bağlanması, fagositik hücreler için ligandların ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile sonuçlanan bir olaylar dizisi başlatır (3).

Tablo-6: Kaspaz türleri.

• Kaspaz 1 (ICE) • Kaspaz 2 (ICH-1) • Kaspaz 3 (CPP32, Yama, Apopain) • Kaspaz 4 (ICErel-II, TX, ICH 2) • Kaspaz 5 (ICErel-III, TY) • Kaspaz 6 (Mch 2) • Kaspaz 7 (Mch 3, ICE-LAP 3, CMH-1)	• Kaspaz 8 (FLICE, MACH, Mch 5) • Kaspaz 9 (ICE-LAP 6, Mch 6) • Kaspaz 10 (Mch 4, FLICE 2) • Kaspaz 11 (ICH-3) • Kaspaz 12 • Kaspaz 13 (ERICE) • Kaspaz 14 (MICE)
---	---

Kaspazlar biyolojik fonksiyonlarına göre 3 ana grupta incelenmektedir (2).

II.A.a.d.c. Sitokin Aktivasyonu Yapan (inflamatuvar) Kaspazlar

Sitokin sekresyonu ve inflamasyondan sorumludurlar (5). Bunlar lenfokin üretiminden de sorumludur. Lenfokin; özel bir akyuvar tipi olan

lenfositlerin ürettiği bir maddedir. İmmün sistemdeki diğer hücreler üzerinde etkisi vardır. Bu gruba dahil olan kaspaz türleri; kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14 tür. Ayrıca kaspaz 1, 4, 5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler (2).

II.A.a.d.d. Başlatıcı Kaspazlar

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara yani ikincil kaspazlara ileten kaspaz türleridir (180). Kaspaz 2, 8, 9 ve 10 başlatıcı kaspazlar grubunda yer almaktadır. Başlatıcı kaspazların üç önemli özelliği vardır; farklı şekillerde gelen uyarıları, genel bitirici faza taşırlar, yeterli miktarda bitirici kaspazın aktifleşmesini sağlayarak apoptotik sinyalin çoğalmasını sağlarlar, ölümün en son basamağında bir kontrol noktası olarak bulunurlar (180). Apoptotik ölüm işlem sırasına göre kaspazlardan ilk görev alanlar başlatıcı ya da öncü kaspazlardır ve bunların uzun öncül bölgeleri bulunur.

II.A.a.d.e. Apoptozu Yürüten (Efektör) Kaspazlar

Efektör kaspazlar, ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (181). Apoptozda sonlandırıcı kaspazlar olarak görev almaktadırlar. Kaspaz 3, 6 ve 7 bu gruba dahil olan kaspaz türleridir (181). Kaspaz 3, 6 ve 7 başlatıcı kaspazlardan farklı olarak kısa bir N-terminal peptid (23-28 aminoasitlik) bulundurulur. Substrat ve inhibitör özgüllüğünde kaspaz 3 ve 7 genellikle benzerdir. Kaspaz 6 ve 7, kaspaz 3 tarafından aktifleştirildiği için bitirici kaspazlar olarak sınıflandırılırlar.

II.A.a.d.f. Kaspazların Aktivasyonu

Kaspazların en az 3 yolla aktive edilebildiği gösterilmiştir: Otoaktivasyon, transaktivasyon ve non-kaspaz proteazları ile proteoliz (182). Prokaspazlar düşük fakat saptanabilir bir proteolitik aktiviteye ve belli koşullar altında otoaktivasyon potansiyeline sahiptir. Wild tip kaspazların aşırı salınımı ile prokaspaz 8 veya prokaspaz 9 uzun subunitleri arasındaki protein etkileşimi aracılığıyla oligomerler oluşturulur. Prokaspazların oligomerizasyonu otoaktivasyon için gereklidir. Başlangıç kaspazları bir kez aktive

olduğunda diğer prokaspazları transaktive eder. Kaspaz aktivasyonu için diğer bir mekanizmada non-kaspaz proteazları ile direk proteolizdir. Örnek olarak sitotoksik T hücre proteinazı, granzim-B, bir aspartat-spesifik serin proteinazı prokaspaz 3 ve 7'nin etkin bir aktivatörüdür. Granzim-B ayrıca prokaspaz 8, 9 ve 10'un aktivasyonunda da görev alır (183). Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya 29 fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu), ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, ya da kaspaz 9 bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir. Kaspaz ailesinin ve kaspaz inhibitörlerinin keşfi apoptotik hastalıklara terapötik yaklaşımda bizleri cesaretlendirmektedir. Zira farklı kaspazlara spesifik farklı sentetik inhibitörlerin yanı sıra kaspaz aktivasyonunu ya da kaspaz aktivitesini önleyen doğal kaspaz inhibitörleri de bulunmuştur (184). Kaspaz ailesi CED-3'un, Bcl-2 ailesi ise CED-9'un homologudur. Kaspazlar proteolitik kaskadı aktive ederek apoptozu indüklerler. Gerek solucanlarda gerekse de memelilerde temel apoptoz mekanizmaları birbirine benzer. Memelilerde apoptozun farklı formlarındaki ana kontrol noktası mitokondridir (149). Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte irreversibl noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir (185). Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle, ya sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması gerçekleşir (apoptozun başlaması) ya da sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması baskılanır (apoptozun inhibisyonu). Kaspaz aktivasyonunun başlaması için mitokondrinin devreye girmesi gereklidir. Apaf-1 latent sitozolik bir protein olup mitokondri tarafından salınan sitokrom c ile bağlanarak kompleks oluşturur. Bu da inaktif prekürsör haldeki kaspaz 9'u aktive eder (184,186).

II.A.a.d.g. Apoptozda Kaspaz 3'ün Önemi

Diğer kaspazlar gibi kaspaz 3 de prokaspaz olarak sentez edilir. Kaspaz 3; kaspaz 9, kaspaz 8 ve kaspaz 10 ile birlikte aktive edilirler (187)(6). Daha sonra kaspaz 3, kaspaz 6 ve 7'yi aktive etmektedir. Kaspaz 3 apoptozun efektör fazındaki en önemli kaspaz rolünü üstlenir. DNA fragmentasyonunda, DNAase aktivasyonuna sebep olan kaspaz 3'ün direk rolü olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda kaspaz-3'ü kodlayan gen, kromozom 4 üzerindedir (q33-q35.1) eşlenir ve 2.635 baz çifti içeren yedi ekzon içerir. Bu gen embriyonun 4. günden itibaren gelişimden sorumludur. Kaspaz-3'teki eksiklik 3 haftalık embriyoda ölüme neden olabilmektedir (188).

Kaspaz-3 (CASP3) sitotoksik ilaçlara, radyoterapiye veya immünoterapiye hücre sel maruziyet sırasında aktive olan apoptozun ana aracısıdır (187). Genellikle kanser tedavisinin etkinliği için bir belirteç olarak kullanılır. Kaspazların veya özellikle kaspaz-3'ün inhibisyonu, apoptozu hafifletir ve birçok akciğer hasarına karşı koruma sağlayabilir (189).

II.A.b. Apoptozis ve Nefrotik Sendrom

Dokulardaki hücre sayısı, hücre doğumu ve hücre ölümü arasındaki denge aracılığıyla dikkatle düzenlenir. Bu süreçler arasındaki bir dengesizlik, aşırı veya yetersiz hücre sayısı ile karakterize edilen hücre sayısı bozukluklarına neden olabilir (190). Hücre sayıları böbrek hastalıklarında sıklıkla anormaldir. Renal parankimal hücre sayısındaki değişiklikler, hücre doğumu (mitoz) ve programlanmış hücre ölümü (apoptoz) arasındaki dengeden kaynaklanır (190). Apoptoz, hücre dışı mikro çevre ve terapötik müdahaleye uygun olabilen hücre içi faktörler tarafından doğrudan düzenlenen hücre ölümünün aktif bir şeklidir (191). Bu nedenle, renal hücre ölümünü düzenleyen faktörleri anlamak, lökositlerin ve fibroblastların temizlenmesi, parankimal renal hücre kaybı ve böbrek hasarından sonra yeniden şekillenme gibi apoptozun rol oynadığı süreçleri kontrol etmeye yönelik stratejilerin tasarlanmasına yardımcı olabilir (192). Birçok böbrek hastalığı, esas olarak monositler/makrofajlar ve T hücrelerinden oluşan bir mononükleer hücre infiltratı ile karakterize edilir. İnflamatuar hücreler,

parankimal hücre apoptozisine neden olan faktörleri sağlar. Monositler/makrofajlar; tümör nekroz faktörü (TNF), FasL, oksijen radikal türleri ve nitrik oksit (193) salgılar. İnflamatuar hücrelerin apoptoz ile temizlenmesi, renal inflamasyonun çözülmesine katkıda bulunur ve bu klirensin başarısızlığı, inflamatuvar sürecin devam etmesine katkıda bulunabilir. Apoptotik lökositlerin membran bütünlüğünü kaybetmeden uzaklaştırılamaması, lokal doku hasarını alevlendirme ve kemotaktik fragmanları serbest bırakmak için hücre dışı matris proteinlerinin bölünmesi yoluyla lökosit akışını sürdürme potansiyeli kanıtlanmış, zararlı içeriklerinin kontrolsüz salıverilmesine yol açacaktır (85). Sıçanlardaki nefrotoksik nefritte nötrofillerin apoptozisi belirgindir ve insanlarda akut enfeksiyon sonrası glomerülonefritte gözlenen yüksek apoptoz oranından sorumlu olabilir (194). Apoptotik lökositler, mezanjiyal hücreler gibi lokal hücreler tarafından yutulur. Bu, Bcl-2, Fas ve FasL gibi apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonunu değiştirerek böbrek hasarına neden olabilir (190). Apoptoz, kendi antijenlerini sunmanın bir sonucu olarak kendi başına otoimmünite oluşturabilir (195). Apoptotik hücreler yeterince temizlenmezse, içerikleri salınabilir ve bu otoimmün yanıtı daha da uyarabilir. Çocukluktaki nefrotik sendrom, örneğin lenfositlerin mitojenlere anormal tepki vermesi (196) ve baskılayıcı T-lenfosit disfonksiyonu (197) dahil olmak üzere T lenfositlerin çeşitli in vivo ve in vitro anormallikleri ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, NS'li hastalarda dolaşımdaki sitokinlerin dengesizliği ve çeşitli lenfosit alt kümelerinin dağılımında anormallikler gözlenmiştir (198)(199). T lenfositlerdeki anormallikler yaygın olarak bildirilse de bunların NS patogeneziindeki rolü bir sorun olmaya devam etmektedir. Lenfositlerin artan apoptozunun, NS'li hastalarda zaten tanımlanmış olan anormal sayılarına ve işlevlerine katkıda bulunması olasıdır (190).

PNS(primer nefrotik sendrom) ile ilişkili ana patolojik mekanizmalar podosit ve glomerüler hasardır (103,200). Podosit hasarının en tipik özelliği, glomerüler bazal membranın dış yüzeyinden podosit dökülmesi veya apoptozdur (103,201). Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi fenotipik dönüşüme yol açar, bu da podositlerin epitel özelliklerini kaybetmesine ve

hareket ve göç yeteneği kazanmasına neden olur (202). Glomerüler skleroz oluşumu ve gelişimi podosit hasarına neden olabilir. Proteinüri, PNS'nin önemli bir klinik özelliğidir ve podosit hasarı da proteinürinin bir nedenidir (203).

Hücreler oksidatif stres tarafından boğulduğunda, hücre ölümü sinyallemede yer alan genler, apoptozu veya nekrozu indüklemek ve geri dönüşü olmayan hasarlı hücreleri çıkarmak için aktive edilir (204). Bu nedenle, apoptoz seviyesindeki bir artış, böbrek hasarının patogenezinin altını çizebilir. Ayrıca, sıklıkla ilişkili olan oksidatif stres ve inflamasyon, böbrek hastalığının karakteristik özellikleridir (205). Hücre büyümesi, hücre döngüsü, apoptoz ve farklılaşma süreçlerinin düzenlenmesinde yaygın olarak yer alan mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesinin bir üyesi olarak hücre dışı düzenlenmiş protein kinaz (ERK), hücre içi sinyal iletiminin önemli bir sinyalidir (206). İki ana ERK alt tipi olan ERK1 ve ERK2, amino asit seviyesinde %84 özdeş olan aynı genin (207) iki ekleme varyantı tarafından kodlanan proteinlerdir (208). Diyabetik nefropatili farelerin renal biyopsi dokularında ERK1/2 protein ekspresyonunun artımlı olduğunu bulmuştur (209). Bununla birlikte, PNS böbrek dokusunda ERK1 / 2 ekspresyonu nadiren bildirilmiştir (203).

Podosit olarak da adlandırılan glomerüler visseral epitel hücresi, sınırlı bir mitotik kapasiteye sahip, son derece özelleşmiş ve terminal olarak farklılaşmış bir hücredir. Bu nedenle, Podositlerin kaybolması durumunda değiştirilme yeteneği sınırlıdır. Düşük podosit sayısının, diyabetik ve diyabetik olmayan böbrek hastalığında ilerleyici böbrek yetmezliğine yol açan glomerüloskleroz gelişiminin altında yatan kritik bir belirleyici olduğunu gösteren giderek artan bir literatür vardır (210). Azalan podosit sayısı, hücrelerin glomerüler bazal membrandan ayrılmasından ve/veya apoptozdan (programlanmış hücre ölümü) kaynaklanır (211). Renal ve renal olmayan hücre apoptozunun altında yatan mekanizmalar arasında tümör baskılayıcı protein p53 (212), Bcl-2 ile ilişkili aile proteinleri (213) ve kaspazlar (214). P53, proliferasyonun yanı sıra çeşitli apoptoz biçimlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (215). Artan p53, hedef genlerin

transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla apoptozu veya hücre döngüsü durmasını indükler (216). Hem proapoptotik (örneğin, Bad, Bax) hem de antiapoptotik (örneğin, Bcl-2, Bcl-xL) üyeler içeren Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazların ve mitokondriyal disfonksiyonun yukarısında kontrol noktaları olarak işlev görür. Kaspazlar, birçok apoptoz formunun yürütme sürecinin altında yatan sistein proteazlarıdır. Bununla birlikte, podosit apoptozunun moleküler mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir (210).

II.A.c. Pro-Apoptotik ve Anti-Apoptotik Protein Dengesinin Bozulması

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki denge hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, bazı genlerin aşırı veya yetersiz ekspresyonunun, kanser hücrelerinde apoptozu azaltarak karsinogeneze katkıda bulunduğu bilinmektedir (160).

BCL-2 protein ailesi

BCL-2 protein ailesi, apoptozun düzenlenmesinde intrinsik yolda önemli bir rol oynayan pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerden oluşur. BCL-2 proteinlerinin tümü mitokondri dışı membranında konumlanır (217). İşlevlerine ve BCL-2 homoloji (BH) alanlarına göre BCL-2 protein ailesinin üyeleri üç gruba ayrılır. İlk grup, dört BH alanının tümünü içeren anti-apoptotik proteinlerdir ve hücreyi apoptotik uyarılardan korurlar. BCL-2, Bcl-XL, MCL-1, BCL-W, A1/BFI-1 ve BCL-B/BCL2L10 proteinleri bu grupta yer alır. İkinci grup, yalnızca BH-3 proteinlerinden oluşur. Bu gruptaki proteinler BID, BIM, PUMA, NOXA, BAD, BMF, HRK ve BIK'dir. DNA hasarı, büyüme faktörü eksikliği ve endoplazmik retikulum stresi gibi hücresel strese apoptozun başlatıcıları olarak aktive edildikleri için pro-apoptotiktirler. Üçüncü grubun üyeleri, dört BH alanını da içerir ve bunlar pro-apoptotiktir. BAX, BAK ve BOK/MTD bu gruptadır. Pro-apoptotik BCL-2 üyeleri apoptozu indüklerken, anti-apoptotik BCL-2 üyeleri apoptozu engeller (218). BCL-2 protein ailesinin anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerinin dengesindeki

bozulma, apoptoz mekanizmasında düzensizliklere yol açabilir. Bu duruma, bir veya daha fazla anti-apoptotik proteinin aşırı ifadesi, bir veya daha fazla pro-apoptotik proteinin yetersiz ifadesi ya da her iki durumun birlikteliği neden olabilir (160).

P53

P53 proteini, 17. kromozomun kısa kolunda (17p13.1) yer alan TP53 tümör baskılayıcı gen tarafından kodlanan ve en iyi bilinen tümör baskılayıcı proteinlerden birisidir. İsmi molekül ağırlığından (53 kDa) almaktadır (219). Apoptozun uyarılmasında, hücre döngüsünün düzenlenmesinde, hücre yaşlanmada, DNA rekombinasyonunda ve gen amplifikasyonunda (220) rol oynamaktadır ve "genomun gardiyanı" olarak adlandırılır (221). İnsan kanserlerinin %50'den fazlası p53 genindeki mutasyonlar ile ilişkilidir.

Apoptoz süreci, çok hücreli organizmalarda yüksek oranda korunur ve genetik olarak kontrol edilir (222). DNA hasarı, hipoksi ve belirli onkoproteinlerin (örneğin Myc, Ras) ekspresyonu gibi uyarılar, p53'e bağlı apoptotik yolu aktive eder. Bir kez uyarıldığında; p53, antiapoptotik faktörleri (örneğin, Bcl-2) baskılarken proapoptotik faktörleri (örneğin Bax) aktive ederek apoptoza giden yolu açar. İyi bilinen bir tümör baskılayıcı olan p53, hücre döngüsünde apoptozu başlatmak için kritik işlevi ve geri kazanılabilir hücrelerde hücre ölümünü ve DNA onarımını indükleme yeteneği ile tanınır. P53 dışında apoptozu etkileyebilen (örneğin, pRb, p21) birçok hücre döngüsü düzenleyicisi vardır (150).

II.B. Anti-Apoptotik Proteinler

Apoptoz, apoptoz inhibitörü protein (IAP) ailesi ve Bcl-2 ailesinin üyeleri gibi farklı pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler tarafından düzenlenen hücresel bir süreçtir (223-224).

Canlı hücrelerde, kaspazlar, anti-apoptotik - Apoptoz Proteinlerinin İnhibitörleri (IAP) tarafından kontrol edilir (225).

Apoptotik yayılmanın bir başka temeli, mitokondriyal dış zarın (MOM) stabilitesini ve bütünlüğünü düzenleyen Bcl-2 ailesi proteinleridir. Bu, özellikle

Cyto c'nin salınması ve mitokondrinin aşağısındaki kaspazların aktivasyonu için kritiktir (225).

Araştırmalar, otoimmün hastalıkları olan bireylere otoantijenlerin tekrar tekrar uygulanmasının, apoptozu indükleyerek ve dolayısıyla bu otoantijenlere spesifik olarak saldıran lenfositlerin temizlenmesini sağlayarak onları iyileştirebileceğini göstermiştir. Bcl-2 protein ailesinin üyeleri, anormal ekspresyonları birçok hastalığa neden olduğu için önemli ilaç hedefleri haline gelmiştir (218). Protein ailesinin ilk üyesi ve apoptoz inhibitörü olan Bcl-2, kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkması ve ilerlemesi için çok önemlidir. Tipik bir örnek, Bcl-2 ekspresyonunun eksikliğinden ve dolayısıyla kardiyomiyositlerin aşırı ölümünden kaynaklanan kardiyak enfarktüstür. Kardiyomiyositlerde Bcl-2'nin aşırı ekspresyonuna izin vermek apoptozu önler ve kalp enfarktüsü için erken aşama terapötik bir önlem haline gelmiştir (226). Apoptozu dengeli bir duruma ayarlamak, hastalıkları tedavi etmeye hizmet edebilir (227).

Yenidoğan ve yaşlılarda serebral iskeminin neden olduğu apoptozun yanı sıra Alzheimer hastalığı, retinal dejenerasyon, transplant reddi ve nörodejeneratif hastalıkların tümü aşırı apoptozdan kaynaklanır. Bu nedenle kaspazları inhibe etmek etkili bir terapötik plandır (7).

II.B.a. Apoptoz, Kanser ve İlaç Direncinde Bcl-2 Ailesi Proteinlerinin Rolü

Bcl-2 ailesi, hem (Bcl-2, Bcl-xl ve Mcl-1) gibi anti-apoptotik üyeleri hem de (Bax, Bak ve Bid) gibi pro-apoptotik proteinleri içerir (228-230). Birçok Bcl-2 ailesi proteini, C-terminallerinde mitokondrinin dış zarına yerleşmelerine izin veren bir hidrofobik transmembran (TM) sabitleme alanı içerir (231). Apoptotik uyarılar üzerine, Bax ve Bak gibi pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri mitokondriyal dış zarda oligomerize olabilir ve Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliğini (MOMP) indükleyerek apoptozu teşvik edebilir (232-233). Bax, ağırlıklı olarak canlı hücrelerin sitozolünde bulunur, ancak mitokondri yüzeyi ile sitozol arasında yer değiştirirken, Bak çoğunlukla mitokondrinin dış zarında bulunur (234). Özellikle, Bcl-2, Bcl-xl ve Mcl-1,

MOMP'yi destekleyen Bax kanalı oluşturma aktivitesini bloke ederek apoptozu inhibe eder (225).

Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin upregülasyonu, karsinogenez ile ilişkili yaygın bir fenomendir. Örneğin, Bcl-2'yi aşırı eksprese eden transgenik fareler , nispeten düşük bir oluşum oranında da olsa spontan tümörler geliştirir (235). Yüksek Bcl-2 seviyeleri ayrıca kanser hücrelerinin dengesini hayatta kalmaya doğru kaydırır ve kemorezistansa katkıda bulunabilir (225).

II.B.b. Apoptoz, Kanser ve İlaç Direncinde IAP Proteinlerinin Rolü

Apoptoz proteinleri inhibitörü (IAP'ler), apoptozisi, sitokinezi ve sinyal iletimini düzenleyen yapısal ve işlevsel olarak birbirine benzer protein grubudur. Apoptoz İnhibitörleri (IAP) protein ailesi, iltihaplanma, bağışıklık, hücre göçü ve hücre ölümü için önemli olan genlerin ekspresyonunu düzenleyen ubikuitine (Ub) bağımlı sinyal olaylarını kontrol eder (225). Bugüne kadar, NAIP (BIRC1), c-IAP1 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC3), X'e bağlı IAP (XIAP, BIRC4), Survivin (BIRC5), Apollon (BRUCE, BIRC6), Livin/MLIAP (BIRC7) ve IAP benzeri protein 2 (BIRC8) olmak üzere sekiz IAP tanımlanmıştır (236-237). Kaspazların endojen inhibitörleri olan IAP'ler, korunmuş BIR alanlarını kaspazların aktif bölgelerine 27 bağlayarak, aktif kaspazların bozunumuna yol açarak veya kaspazların substratlarına bağlanmasını engelleyerek kaspaz aktivitesini inhibe edebilirler (238). Birçok kanserde düzensiz IAP ekspresyonu bildirilmiştir (160).

Çeşitli kanser türlerinde yüksek IAP protein seviyeleri bildirilmiştir (239). Özellikle, XIAP lösemide ve ayrıca şu karsinomda aşırı eksprese edilir: akciğer, kolon, melanom , yumurtalık, mesane , böbrek, meme, prostat ve tiroid (240). Kolon ve mesane kanserinde ve servikal B hücreli kronik lenfositik lösemide artan cIAP1 seviyeleri bulunmuştur (240).

II.B.c. XIAP

XIAP, endojen kaspaz inhibitörleri ailesini temsil eden apoptoz inhibitörü proteinlerine (IAP) aittir (241). Diğer insan IAP'leri gibi, XIAP de esas olarak apoptozu bloke ederek hücre ölümünü engeller. 1996 yılında keşfedilen ve apoptoz proteininin X'e bağlı inhibitörü olan XIAP, kaspazları bağlayarak ve inhibe ederek hücre ölümü sinyal yollarını düzenler (242). XIAP, en önemli üç apoptoz efektör kaspazının, kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'un aktivitesini doğrudan engelleyebilen tek IAP'dir (243).

Ek olarak, XIAP, kaspazların ubiquitin-proteazom aracılı bozunmasını destekler (244). XIAP'nin yokluğu veya inhibisyonu, apoptozu indükleyen sinyal kompleksinin oluşumunu ve aktivasyonunu artırır ve hücrelerin çoğunluğunun, TNF-alfa ile olduğu gibi apoptozis reseptörünün neden olduğu apoptoza duyarlı hale gelmesini sağlar (245-246).

Genetik

XIAP, 6 kodlama ekzonundan oluşan XIAP/BIRC4 geni tarafından kodlanır (247). Bugüne kadar 90'dan fazla hastalığa neden olan mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyonlar genin uzunluğu boyunca dağılır ve anlamsız ve yanlış anlamlı mutasyonları, büyük tam ekzon silmelerini, küçük eklemeler ve silmeleri içerir, genellikle çerçeve kayması mutasyonuna yol açar ve intronik mutasyonları içerir. Anlamsız mutasyonlar ve delesyonlar genellikle XIAP proteininin yokluğuna yol açarken, yanlış anlamlı ve ek yeri mutasyonları, tam uzunlukta veya kesilmiş, ancak işlevsiz veya işlevsiz proteinin kalıntı ifadesine yol açabilir (247).

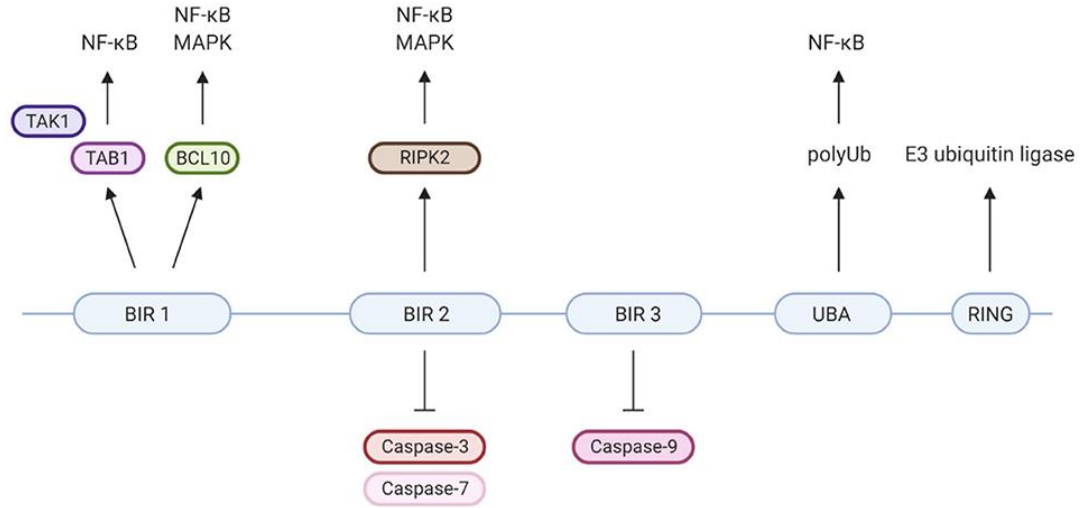
Bir XIAP/BIRC4 mutasyonunun dışı taşıyıcıları genellikle asemptomatiktir. Bununla birlikte, HLH benzeri hastalık, kolit ve cilt belirtileri dahil olmak üzere çeşitli semptomları ifade eden semptomatik kadın taşıyıcılar tanımlanmıştır (248).

XIAP Protein Yapısı ve İşlevi

XIAP, apoptoz inhibitörü (IAP) protein ailesine ait yüksek oranda korunmuş, her yerde eksprese edilen bir proteindir (247). CIAP-1 ve CIAP-2 ile ortak önemli yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahiptir. Protein 497 amino asit uzunluğundadır ve üç çinko bağlayıcı bakulovirüs IAP tekrar (BIR)

alanından (IAP'lerin ayırt edici özellikleri), bir ubiquitin ile ilişkili (UBA) alandan ve RING (really interesting new gene) parmak alanından oluşur (Şekil-5) (249). BIR alanları kaspaz-3, -7 ve -9'u doğrudan inhibe ederek XIAP'ye anti-apoptotik aktivitesini verir (248,250). XIAP'nin iyi bilinen anti-apoptotik özelliklerinin yanı sıra, daha yakın tarihli çalışmalar, XIAP'nin bağışıklıkta temel işlevlere sahip olduğunu göstermiştir. XIAP'ın BIR alanları, spesifik bir peptit dizisine, IAP-bağlama motifine (IBM) bağlanarak kaspaz olmayan protein etkileşimlerinde yer alır (247). Bu etkileşimler, XIAP'nin çeşitli sinyal yollarındaki rolüne aracılık eder. UBA alanı, doğrudan poliubikuitin (polyUb) zincirlerine bağlanabilir, böylece XIAP'nin Ub'ye bağlı sinyal yollarına katılmasını sağlar (251). Son olarak, RING alanı E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahiptir, bu da XIAP'nin proteazomal bozunma için proteinleri hedeflemesini veya modifiye edilmiş proteinlerin aktivitesini değiştirmesini sağlar (247).

XIAP'ın BIR2 ve 3 alanlarının kaspaz 3, 7 ve 9'u doğrudan engellediği iyi bilinmektedir (şekil-5) (250,252). BIR1, XIAP içinde BCL10 bağlayıcı bölge olarak izole edilmiştir. Bu etkileşim Dectin-1 sinyal yolunda rol oynar (253). Ayrıca BIR1, NF- κ B ve MAPK yollarının aktivasyonu için gerekli olan TAB1/TAK1 kompleksini tanıyabilir (254). BIR2, NF- κ B ve MAPK aktivasyonuna yol açan NOD1/2 (Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein 1/2) sinyal yollarında gerekli bir adımı oluşturan RIPK2 ile etkileşime girer (255). UBA alanı, poliubikuitin zincirlerini doğrudan bağlayabilir ve muhtemelen poliubikitinlenmiş NEMO'ya bağlanması yoluyla NF- κ B'nin aktivasyonu için gereklidir (256). XIAP'nin C-terminal RING parmak alanı, E3 ubiquitin ligaz işlevine sahiptir, bu da XIAP'nin proteazomal bozunma için proteinleri hedeflemesini veya protein işlevini değiştirmesini sağlar (247). Örneğin, XIAP'nin ubiquitin ligaz aktivitesi, RIPK2'nin çoklu-ortaklaştırılması yoluyla NF- κ B'nin NOD2 aracılı aktivasyonu için kritiktir (249).



Şekil-5: XIAP'nin protein alanları (247).

UBA: Ubikuitin ilişkili alan, **BIR:** Bakulovirüs IAP tekrar, **polyUb:** poliubikuitin, **NF-κB:** Nuclear Factor kappa B, **RIPK2:** Reseptörle etkileşen serin / treonin-protein kinaz 2, **TAK1:** dönüştürücü büyüme faktörü-β ile aktive olan kinaz 1, **BCL10:** B-hücreli lenfoma/lösemi 10.

Anti-apoptotik işlevleri sayesinde XIAP, adaptif immün yanıtta yer alır (247). Bu nedenle, enfeksiyon üzerine, virüse özgü T hücrelerinin genişlemesinin, XIAP eksikliği olan hastalarda optimalin altında olduğu düşünülmektedir (247).

XIAP eksikliğinde hem adaptif bağışıklık tepkisi hem de doğuştan gelen bağışıklık tepkisi tehlikeye girer (247). Ek olarak, hücre içi patojenler, XIAP'nin yokluğunda ksenofaj yoluyla daha az etkili bir şekilde temizlenir. Sonuç olarak proinflatuar sitokinler aşırı üretilir ve hücre ölümü gerçekleşir. Bu da HLH (hemofsgositik lenfositosis), İBD (inflatuar barsak hastalığı), HLH benzeri hastalık, artrit ve diğer inflammatuar fenomenler olarak ortaya çıkabilen kronik bir hiperinflamasyon durumuna yol açar (247).

Ek olarak, Dectin-1 sinyalleme için XIAP gereklidir (253). Dectin-1, mantar hücre duvarlarında bulunan ana karbonhidrat yapısı olan β-glukan'ın tanınması yoluyla antifungal bağışıklıkta rol oynayan bir transmembran PRR'dir (257). Dectin-1 aktivasyonu üzerine XIAP, NF-κB ve MAPK

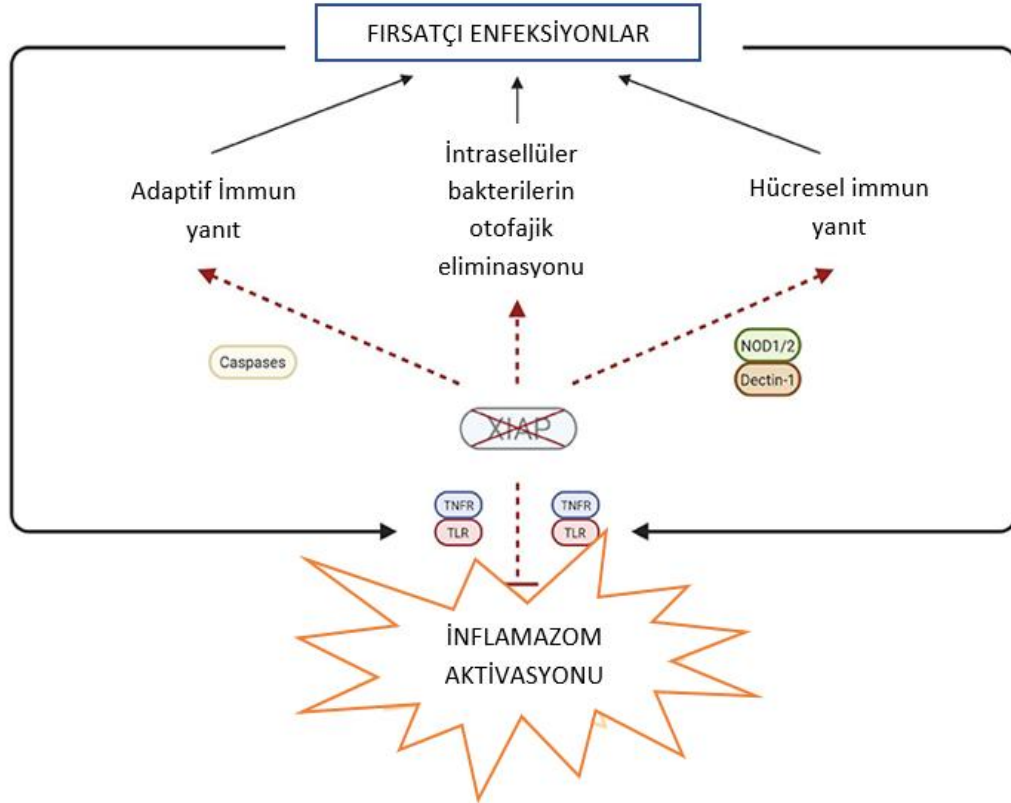
aktivasyonu, sitokin üretimi ve fagositoz için önemli bir adım olan BCL10'u bağlar ve çoğaltır (253).

Ayrıca XIAP, NLRP3 (NLR ailesi pürin alanı 3) inflamatuvarının aktivasyonunun düzenlenmesinde önemlidir (247). XIAP kaybı, klasik kaspaz-1/NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunun düzensizliği, proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi ve hücre ölümü ile sonuçlanır (258-259). İlk açıklanan, XIAP'nin hem TNFR1 (tümör nekrozis faktör reseptör 1) hem de TLR (Toll benzeri reseptör) sinyalini takiben RIPK1, FADD ve kaspaz-8'den oluşan ölüme neden olan bir kompleks olan ripoptozom üzerindeki inhibitör etkisiydi. Bu inhibitör etkiye, RIPK1 ubiquitination'ın XIAP tarafından RIPK3'e bağlı bir şekilde düzenlenmesi aracılık ediyor gibi görünmektedir (258). Daha yakın zamanlarda, XIAP'nin TNFR2 sinyalleşmesinde de rol oynadığı gösterilmiştir. Bu bağlamda, XIAP, TLR-MyD88 ile indüklenen TNFR2 sinyalini takip eden cIAP1'in proteazomal bozulmasını inhibe eder. XIAP kaybı durumunda, cIAP1'in bozulması inflamatuvar aktivasyona yol açar (260). XIAP ayrıca TNFR2 aktivasyonu üzerine meydana gelen RIPK1 kinaz aktivitesine ve ROS üretimine aracılık eder, böylece kanonik inflamatuvar aktivasyonunu ve up regülasyonunu inhibe eder (259). XIAP'nin inflamatuvar regülasyondaki rolünün önemli, ancak karmaşık olmakla beraber henüz tam olarak anlaşılamamıştır (247). Şaşırtıcı bir şekilde, NLRP3'teki fonksiyon kazancı mutasyonlarının neden olduğu Cryopyrin ile ilişkili periyodik sendromu (CAPS) olan hastalar, XIAP eksikliği olan hastalara benzer şekilde tekrarlayan ateş, üveit ve artrit geliştirir, ancak HLH, splenomegali veya IBD geliştirmez (261).

Son olarak, son çalışmalar, XIAP'nin hücre içi bakterilerin otofajik eliminasyonunda rol oynadığını ve lizozomların otofagozomlarla verimli füzyonu için gerekli olduğunu göstermiştir (262-263). Genel olarak, XIAP'nin hem patojenlerin temizlenmesi hem de inflamatuvar yanıtın düzenlenmesi için önemli olduğu açıktır (247).

XIAP eksikliğinde, miyeloid hücreler tarafından sitokin üretiminin azalması ve ardından nötrofillerin ve fagositlerin atraksiyonunun bozulması

ile karakterize edilen, etkisiz bağışıklık tepkisine bağlı olarak patojenlerin anormal kalıcılığı olduğu teoridir (247). Ek olarak, proinflatuar sitokinlerin aşırı üretimi ve lenfositlerin ve miyeloid hücrelerin ölümüyle birlikte kontrolsüz inflammatuar aktivasyon vardır (Şekil 6)(247). Genel olarak bu süreçler, HLH, IBD, HLH benzeri hastalık, artrit ve diğer inflammatuar fenomenlere yol açabilen kronik bir hiperinflamasyon durumuyla sonuçlanır (247).



Şekil-6: XIAP eksikliğinde gözlenen inflammatuar fenomenin altında yatan hastalık patofizyolojisinin basitleştirilmiş modeli (247).

TLR: Tall benzeri hücre, **TNFR:** Tümör nekrozis faktör reseptör 1/2, **NOD1/2:** Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein 1/2, **XIAP:** apoptoz proteininin X'e bağlı inhibitörü.

Apoptoz dışında, XIAP ayrıca bir hücresel kendi kendini yok etme programı olan nekroptozun düzenlenmesine de katılır (242,246). Bugüne kadar, XIAP'nin var olan en güçlü anti-apoptotik ve ölümü önleyen protein olduğuna inanılıyor (242,264). IAP ailesi üyeleri çeşitli hücresel fizyolojik süreçleri düzenlediğinden ve bu moleküllerin düzensizliklerinin (çoğunlukla

up-regülasyonunun) insanlarda tümör oluşumunu, tümör metastazını ve kansere karşı tedavi direncini arttırdığı bilinmektedir (223,225,266). Yüksek XIAP seviyeleri, AML (akut miyeloid lösemi), renal hücreli karsinom (RCC), mide kanseri ve baş ve boyun kanserinde kötü prognoz için bir belirteçtir (267,268). XIAP ekspresyonu ile tümör agresifliği arasında önemli bir ters korelasyon olduğu gösterildi (269). XIAP, hücre ölümünü engelleyerek ve hayatta kalma yolundaki yolları kolaylaştırarak, tümörün başlamasını, ilerlemesini ve ilerlemesini destekler. XIAP'nin zararlı doğası ve XIAP'yi çeşitli kanser türlerine bağlayan artan veriler göz önüne alındığında, odak noktası anti-XIAP ilaçlarının geliştirilmesine yönlendirilmiştir (242).

II.B.d Survivin

1997 yılında keşfedilen survivin, IAP (apoptoz proteinlerinin inhibitörü) ailesinin bir üyesidir (270). Survivin nukleus, sitozol ve mitokondri gibi farklı hücresel kompartımanlarda bulunur. Önceki çalışmalar, survivin'in hücre bölünmesinin düzenlenmesinin yanı sıra apoptozun baskılanmasında da rol aldığını göstermiştir (271).

Apoptozun survivin tarafından inhibisyonunun kesin mekanizması hala bir tartışma konusu ve görüş iki ana teori arasında bölünmüştür. Bir teori, survivin'in aktif kaspaz-3, -7 ve -9'a doğrudan bağlanması ve apoptozu inhibe etmesidir (272). İkinci teori, survivin'in apoptotik yoldaki diğer faktörlerle etkileşime girerek apoptozu inhibe etmesidir (273-274).

II.B.d.a. Genetik

Survivin geni, 17q25 kromozomunda lokalize antiapoptotik proteinlerin en küçüğü olan survivini kodlar (174). Survivin geni (BIRC5: Baculoviral IAP repeat containing 5) 14.5 kb büyüklüğünde olup 17q25.3'de yer almaktadır (275). 4 ekzon ve 3 introndan oluşmaktadır. Proteini 16.3 kDa büyüklüğündedir ve 142 aminoasitten oluşmaktadır. IAP (apoptoz protein inhibitörü) ailesinin en küçük üyesidir, diğer IAP proteinlerinden farklı olarak tek bir BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat) bölgesi içermektedir (276). Bu bölge kaspazları inhibe etme fonksiyonu için

gereklidir. Aynı zamanda karboksil ucunda alfa helikal sarılmış sarmal (coiled coil) bölgesi içermektedir. Ancak diğer IAP proteinlerinde bulunan RING (really interesting new gene) finger bölgesi bulunmamaktadır (277).

II.B.d.b. Survivin Fonksiyonları

Survivin, IAP ailesinin bir üyesidir. Apoptozda rol oynayan bir protein olarak bilinmesinin yanı sıra mitotik eksen ve mikrotübül dinamiklerini düzenleyerek hücre bölünmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Otofaji ve DNA tamirinde görev aldığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (278).

II.B.d.b.a. Survivin Apoptozdaki Rolü

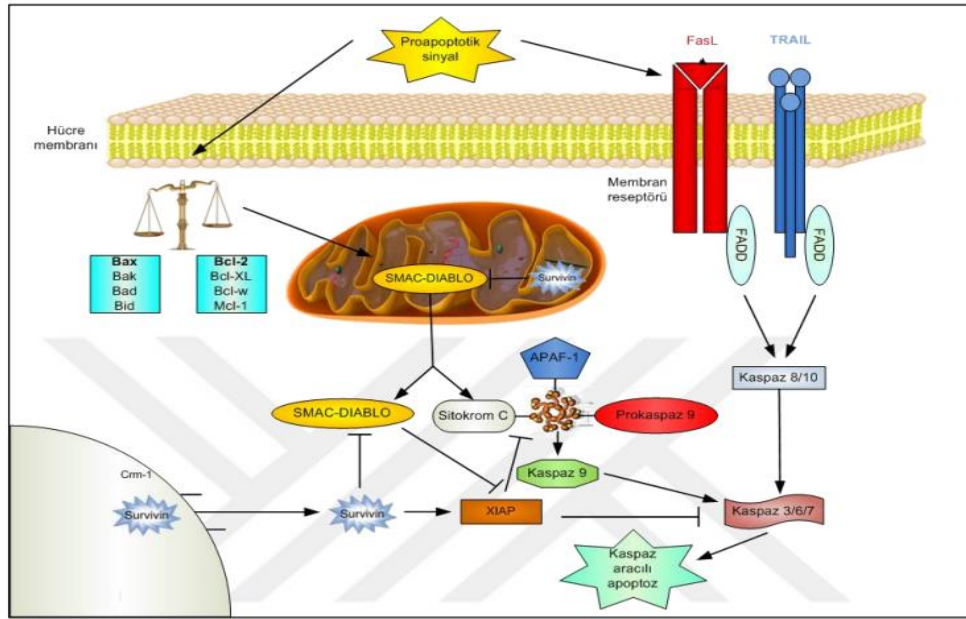
Hücre ölümünün programlı bir şekilde kontrol edildiği, doku homeostasisi için önemli bir süreç olan apoptoz ekstrinsik (ölüm reseptörleri) ve intrinsik (mitokondriyal) olmak üzere iki farklı yolak ile gerçekleşmektedir (279). Kaspaz aktivasyonu her iki yolak için de esansiyeldir. İntrinsik yolda bulunan anahtar düzenleyicilerin birçoğu Bcl-2 (B cell lymphoma 2) ve IAP ailesine aittir. Bcl-2 ailesi üyeleri BH (Bcl-2 homology) bölgelerinden en az birini içermeleri ile karakterize edilmekte ve birbirine zıt etkili proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerden meydana gelmektedir (280).

IAP, intrinsik yolda düzenleyici rol oynayan diğer bir protein ailesidir. IAP ailesi üyeleri, sayıları 1-3 arasında değişen ve antiapoptotik fonksiyon için gerekli olan BIR bölgesini içerirler. Birçok IAP'nin karboksil ucunda RING bölgesi bulunurken, bazılarında CARD (caspase recruitment domain) bölgesi bulunmaktadır (281). Bu ailenin iyi tanımlanmış üyeleri XIAP (X chromosome linked IAP), cIAP1 (cellular IAP1), cIAP2 (cellular IAP2), BIRC6 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing 6) (Bruce/Apollon), ML-IAP 35 (melanoma IAP), ILP2 (IAP like protein 2), NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) ve survivindir (282).

Daha önce yapılan çalışmalar survivinin diğer IAP ailesi üyeleri gibi aktif kaspaz 3, kaspaz 7 ve kaspaz 9'a doğrudan bağlanarak fonksiyonlarını engellediğini göstermiştir (283). Fakat bu durum survivinin kaspazlara bağlanmayı sağlayan yapısal bölgelerden yoksun olması nedeni ile yeteri kadar açıklayıcı olmamaktadır (280). Son çalışmalar survivinin XIAP (X linked

IAP) ile etkileşime girdiğini ve XIAP'nin kaspaz 9'u inhibe etmek için stabil kalmasını sağlayarak apoptozu önlediğini göstermiştir. Ayrıca survivinin apoptozom oluşumunu engelleyerek kaspaz 9 aktivasyonunu baskılamak için HBXIP (hepatitis B virus X interacting protein) ile etkileşimde bulunduğu gösterilmiştir (284). Bütün bu bilgiler ışığında survivinin apoptozu inhibe etmesinde, kaspazlara direkt bağlanması yerine diğer 36 molekül ile iş birliği içerisinde olduğu hipotezi daha fazla kabul görmektedir (285) (Şekil 7).

RCC (renal hücreli karsinom) 'de kaspaz aktivasyonu ve EGFR-ERK yolu inhibisyonu ile birlikte survivinin down- regülasyonu ile hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilen yayınlar mevcuttur (286).



Şekil – 7: Survivin'in apoptoz inhibitör fonksiyonu (285).

XIAP: apoptoz proteininin X'e bağlı inhibitörü, **APAF-1**, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1, **FADD:** Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini, **FasL:** Fas ligandı, **TRAIL:** TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand.

II.B.d.c. Survivin'in Hücre Bölünmesindeki Rolü

Survivin, mitozun düzenlenmesinde anahtar bir yapı olan CPC (chromosomal passenger complex)'nin bir bileşenidir. İğ iplikçiklerinin oluşumu ve sitokinezin tamamlanması için survivinin INCENP (inner

centromere protein), Aurora B (287) ve Borealin/Dasra B (288) proteinleri ile fiziksel iletişimi gereklidir. Survivin, hücre döngüsünün G2/M fazında fosforillenmiş histon H3'e bağlanmakta ve mitotik kinaz Aurora B'yi aktif hale getirmektedir (289). CPC ve Auroranın, survivinin BIR bölgesi vasıtasıyla etkileşimi mitozun tamamlanması için kritik bir süreçtir. Genomun korunması ve mikrotübül dinamiklerinin kontrolü gibi fonksiyonları, survivinin mitoz boyunca hücre döngüsü bağımlı bir şekilde transkripsiyonunu, posttranslasyonel düzenlemeler olarak da p34cdc2 (290) ve Aurora B kinazlar ile fosforilasyonu ve ubiquitinasyonunu gerektirmektedir (291). Ayrıca, survivinin mikrotübüller ile etkileşiminin mitozun başında bozulması onun antiapoptotik fonksiyonlarının kaybı ve kaspaz 3 aktivitesinin artması ile sonuçlanmaktadır (292). Bu sonuçlar survivinin kanser hücrelerinde yalnızca apoptozu inhibe etmediğini aynı zamanda proliferatif aktiviteyi arttırdığını göstermektedir (293).

II.B.d.d. Survivin Otofajideki Rolü

Yapılan çalışmalar survivinin otofaji ile de ilişkili olduğunu göstermiştir. Apoptoz indükleyici TRAIL'a cevap olarak insan glioma hücrelerinde otofaji düzenleyicisi Beclin 1 ve survivin arasında etkileşim olduğu gösterilmiştir (294). Daha sonra CCL2'nin (chemokine (C-C motif) ligand 2) PC3 prostat kanser hücrelerini otofajik hücre ölümünden PI3K-AKT survivin yolağı ile korumakta olduğu gösterilmiştir (295). Birlikte ele alındığında bu çalışmalar survivin ekspresyon artışının otofajiyi inhibe ettiğini bunun yanında survivin ekspresyonunun azalmasının ise otofajiyi ilerlettiğini göstermiştir (278).

II.B.d.e. Survivin DNA Tamir Mekanizmasındaki Rolü

Survivin mitoz, apoptoz ve otofajinin yanında DNA tamir mekanizmasında da yer aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Sahip olduğu NES (nükleer export sinyali) sayesinde çekirdek ve sitoplazma arasında mekik dokumakta ve sitoplazmaya CRM1 (Chromosome 38 region maintenance 1) yapısı vasıtasıyla geçmektedir. Çekirdeğe geçmesi ile DNA tamir mekanizmasının NHEJ (Nonhomologous end joining) yolağında görev yapan Ku70 (ATP dependent DNA helicase II 70 kDa subunit) ekspresyonu

artmakta ve kanser hücrelerinin DNA çift zincir kırıklarını tamir yetenekleri artmaktadır (296). Capalbo ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada radyasyona maruz kalmayı takiben survivinin DNA-PKcs (DNA dependent protein kinase catalytic subunit), MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1), Ku70 ve H2AX (H2A histone family member X) ile kompleks oluşturduğunu göstermişlerdir (297). Ayrıca iyonize radyasyona maruz kalan glioblastoma hücrelerinde survivinin, DNA-PKcs, MDC1, Ku70 ve H2AX ile birlikte lokalizasyonu gösterilmiştir (298).

II.B.d.f. Survivin Normal Dokular ve Tümör Dokularında Ekspresyonu

Survivin ekspresyonu normal dokularda gelişimsel olarak düzenlenmektedir. Farklılaşan birçok dokuda ya hiç bulunmamakta ya da çok düşük seviyelerde mevcut olmaktadır (299). Ancak CD34+ kemik iliği hücrelerinden köken alan kök hücreleri, bazal epitel hücreleri, timositler ve serviksin bazal epitel hücreleri gibi hızlı bölünen normal hücrelerde az düzeyde eksprese edilmektedir (275). Yapılan son çalışmalar survivinin embriyonik gelişim, hematopoetik hücre proliferasyonu, T hücre gelişimi, vasküler endotelial hücre homeostasisi gibi birçok süreçte fizyolojik bir rolü olduğunu göstermiştir (300). İlginç olarak, survivin yüksek derecede farklılaşmış dokuların bazılarında da rapor edilmiştir (301). Survivinın sıçanlarda travmatik beyin hasarı sonrası nöral hücre sağkalımını arttırdığı gösterilmiştir (302). Buna ek olarak, survivin ekspresyonu düşük olan farelerde yapılan çalışmada survivinin böbreğin apoptozdan korunması için gerekli olduğu gösterilmiştir (9). Normal dokularda eksprese olmasına karşın, survivinin ekspresyon düzeyi transforme hücrelerde olduğundan daha az olmaktadır. Birçok çalışma survivinin kolon, akciğer, beyin gibi birçok solid tümör tipinde ve hematolojik malignansilerde yüksek düzeyde eksprese olduğunu göstermiştir. Ekspresyonu çeşitli benign ve neoplastik lezyonda tespit edilmiştir (283). Kanser hücrelerinde yüksek düzeydeki ekspresyonu tümör agresifliği ile ilişkilendirilmektedir. Solid tümör ve hematolojik malignansilerin farklı tiplerinde yapılan çalışmalar yüksek düzeydeki survivin proteininin tümör ilerlemesinde prediktif olabileceğini göstermiştir (303).

Survivin ekspresyonunu düzenleyen birçok mekanizma açıklanmıştır. Normal overlerde survivin geni metilasyon ile susturulmaktadır. Ancak over kanserinde demetile hale gelmekte ve transkripsiyonel olarak aktif olmaktadır (304). P53 gibi transkripsiyonel faktörlerin çeşitli insan kanseri hücre dizilerinde survivin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (305).

III.Resveratrol

Resveratrol (RSV) (3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben), iki karbonlu bir metilen köprüsü ile birbirine bağlanan iki fenil parçasının ortak ortak yapısına dayanan stilben ailesine ait bir polifenoldür (306-307). RSV, üzüm suyunda (0,19-0,96 mg/L) ve kırmızı şarapta (1.9 ± 1.7 mg/L) oldukça yüksek seviyelerde olmak üzere üzüm, çilek ve yer fıstığının kabuğunda bulunur (307-308). Son yıllarda resveratrolun böbrek hasarına karşı koruma, anti-inflamatuar etki, anti-oksidatif etki, kardiyovasküler etki, nöroprotektif etki, akciğer koruyucu etki, karaciğer koruyucu etki, anti-tümör etki, anti-mikrobiyal etki, trombüs oluşumunun inhibisyonu, anti-osteoporotik etki, kemik iliği stromal hücre göçü uyarılması ve immün düzenleyici etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (309-315).

Uchida ve ark., glomerüler mezanjiyal hücrelerin RSV (50-75 μ M) tedavisinin potansiyel proinflamatuar etkilerini göstermiştir (316). Aktive B hücrelerinin nükleer faktör kappa hafif zincir güçlendiricisi (NF- κ B), bir kez aktive edildiğinde enflamatuar ve immün düzenleyici genlerin transkripsiyonel aktivasyonu ile sonuçlanan bir transkripsiyon faktörleri ailesidir. Bu hücreler glomerülonefritli bireylerde aktive olur (317). Proinflamatuar sitokin interlekin-1 (IL-1) veya tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ile birlikte uyarılan glomerüler mezangial hücreler ve RSV tedavisi, NF-KB aktivitesinde artışla sonuçlandı (316). Bu artan proinflamatuar etki, böbrek proksimal tübül LLCPK1 hücrelerinde de gösterilmiştir. Bununla birlikte, glomerüler mezanjiyal hücreler ve LLCPK1 hücreleri tek başına RSV ile tedavi edildiğinde, NF-KB'de önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir, bu da RSV'nin yalnızca

önceden var olan pro-inflamatuar sitokinlerin varlığında proinflamatuar etkiler gösterdiğini düşündürmektedir (316).

Başka bir çalışmada, CRL-2573 (rat böbrek hücresi) mesanjiyal hücrelerinin RSV'ye maruz kalması, yüksek glikozun neden olduğu hücre proliferasyonunun zayıflaması ile sonuçlanmıştır (318)(tablo-7). Ek olarak, RSV, p38 fosforilasyonunda, transforme edici büyüme faktörü- β 1'de (TGF- β 1) ve fibronektin ekspresyonunda yüksek glukoz kaynaklı artışı hafifletmiştir (318)(tablo-7).

SV40 MES 13 (fare mezengial hücresi) hücrelerinin RSV ile tedavisi, artan mitokondriyal membran potansiyeli ve ATP üretimi ile TGF- β 1 ile indüklenen mitokondriyal fonksiyonu zayıflattı ve ROS (reaktif oksijen türleri) üretimini azalttı (319). Ek olarak, RSV, mitokondriyal kompleks I/III aktivitelerini ve fizyon/füzyon (NDUFB8 ve nükleer olarak kodlanmış ATP β) protein seviyelerini artırdı (319), bu da RSV'nin elektron taşıma zinciri üzerinde koruyucu bir etkisi olduğunu gösterir. RSV tedavisi ayrıca sirtuin 1 (SIRT1) protein seviyelerini artırırken, peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama koaktivatörü (PGC)-1 α ve asetillenmiş-PGC-1 α protein seviyelerini azalttı, bu da RSV'nin mitokondriyal koruyucu etkilerinin SIRT1 aktivasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (319) (tablo-7).

Bir araştırmada TCMK-1(fare tubulus hücresi) renal epitel hücrelerinin RSV ile tedavisi, kadmiyum kaynaklı apoptozun azalmasına ve hücre canlılığının artmasına neden oldu (320) (tablo-7). Mitokondriyal biyogenezin önemli düzenleyicileri olan mitokondriyal PGC-1 α ve süperoksit dismutaz 2 (SOD2) mRNA ekspresyonu, RSV ile tedavi edilen kadmiyum kaynaklı TCMK-1 (dönüştürülmüş fare böbrek hücresi) hücrelerinde artmış olarak görüldü. RSV tedavisi ile mitokondriyal ROS (mROS) üretimi azaltılmış ve mitokondriyal SIRT3 protein seviyesi ve aktivitesi artırılmıştır (320) (tablo-7).

HK-2 hücrelerinin RSV (5–20 μ M) tedavisi, TGF- β ile indüklenen EMT'yi (epitelden mezenkimal geçiş) doza bağlı olarak azalttı (321) (tablo-7). SIRT1 ve epitel hücre belirteci E-cadherin protein seviyeleri artarken,

fibrotik belirteçler, α -düz kas aktin (α -SMA) ve fibronektin seviyeleri RSV tedavisi ile azaldı. Bu sonuçlar, SIRT1 inhibitörü EX527'nin birlikte kullanımı ile ortadan kaldırılmıştır ve bu, RSV'nin etkilerine Sirt1 sinyallemesinin aracılık ettiğini düşündürmektedir (321). RSV tedavisi ayrıca Smad3'ün fosforilasyonunu azalttı ve böbrek fibrozunun ilerlemesinde rol oynayan önemli bir etkileşim olan SIRT1'in Smad3 ve Smad4'e bağlanmasını azalttı (321). Bununla birlikte, yüksek dozlu RSV tedavisi (40 μ M), mitokondriyal oksidatif ROS üretimini, fibronektin, α -SMA ve pro-apoptotik Bax protein seviyelerini artırırken, anti-apoptotik Bcl-2 protein seviyeleri azaltılarak sitotoksikite ve fibrotik genetiğin arttığını gösterir. Ek olarak, mitokondri uzunluğu ve yoğunluğu, ATP üretimi ve mitokondriyal biyogenez proteini [PGC-1 α ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM)] seviyeleri yüksek doz RSV tedavisi ile azalmıştır, bu da mitokondriyal disfonksiyonu gösterir (321). Bu nedenle, düşük RSV konsantrasyonları hafifletirken, yüksek RSV konsantrasyonları HK-2 hücrelerinde oksidatif strese ve fibrotik etkilere aracılık eder (321) (Tablo-7).

Böbrek podositleri, Bowman kapsülündeki glomerulusun kılcal damarlarının etrafını saran hücrelerdir. Fonksiyonel olarak podositler, renal endotelyal hücrelerle birlikte filtrasyon bariyerini oluşturur ve glomerül fonksiyonunu düzenlemek için mezanjiyal hücrelerle etkileşime girer (322). Yang ve ark. (323), transdiferansiasyonu indüklemek için fare podositlerini TGF- β 1 ile tedavi edip, ardından RSV tedavisi verilmesi, podosit tek tabakası boyunca önemli ölçüde azalmış albümin geçirgenliği ile sonuçlanmıştır, bu da podosit ölümünün azalttığını ve E-kadherin eksprese eden hücrelerin yüzdesinin artırdığını göstermektedir (323). Ek olarak, RSV tedavisi ile podositler korunarak adezyon molekülleri P-cadherin, zonula occludens-1 (ZO-1) ve IRRE benzeri protein 1 (NEPH1) seviyeleri önemli ölçüde artarken, α -SMA protein seviyeleri azaldı (323) (Tablo-7).

Podositlerin RSV ile tedavisi, tümü diyabetik nefropati gelişiminde rol oynayan yüksek glikozun neden olduğu mitokondriyal stresin zayıflaması, mROS üretiminin azalması ve membran potansiyelinin artması ile sonuçlanmıştır (324). Ek olarak, RSV tedavisi, solunum zinciri kompleksi I ve

III aktivitesini artırırken, proapoptotik proteinlerin (sitokrom C ve diablo) mitokondriden salınımını azalttı, bu da mitokondriyal işleyişin iyileştiğini ve podosit hasarının azaldığını düşündürdü. Ek olarak, SIRT1, PGC-1 α , nükleer solunum faktörü 1 (NRF-1) ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü a (TFAM) mRNA ve protein seviyeleri RSV tedavisi ile arttı (324)(Tablo-7).

İnsan böbrek kanseri hücrelerinin (786-0) RSV ile tedavisi, azalmış VEGF mRNA ve protein seviyeleri ile ilişkili olan hücre büyümesinin azalmasıyla sonuçlandı (325)(Tablo7). Sinyal dönüştürücüler ve transkripsiyon (STAT) proteinlerinin aktivatörlerinin, böbrek kanseri de dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde up-regülasyonu görülür. Caki-1 ve 786-0 böbrek kanseri hücrelerinin RSV ile tedavisi, hücre apoptozunu desteklediği ve azalan koloni oluşumu ile görüldüğü gibi hücre sağkalımını azalttığı görüldü (325). RSV, fosfo-STAT3 (tirozin 705 ve serin 727), fosfo-STAT5 (tirozin 684 ve tirozin 699) ve nükleer STAT3 ve STAT5 protein seviyelerini inhibe ederken, protein tirozin fosfataz (protein tirozin fosfataz (PTP) ϵ ve Src homoloji-2 alanı fosfataz (SHP-2) içeren mRNA ve protein seviyelerini arttırdığı görüldü (325). Ek olarak, fosforile edilmiş kinazların [Janus kinaz (JAK)1, JAK2 ve Src] protein seviyeleri, RSV tarafından önemli ölçüde inhibe edildi. Bcl-2, bcl-xL, survivin, apoptoz inhibitörü (IAP)-1 ve IAP-2 protein seviyeleri azalırken, kaspaz-3 protein seviyesi ve poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) bölünmesi RSV ile her iki böbrek kanseri hücre hattında artırıldı (325)(Tablo-7).

Kadmiyum ile indüklenen Kummig farelerinin 1 hafta süreyle RSV (10 mg/kg/gün) ile tedavisi, BUN ve serum kreatinin düzeylerinde azalma ile sonuçlandı (320). Ek olarak, RSV tedavisi kaspaz-3 aktivitesini ve Bax protein seviyelerini azaltarak böbrek hücre apoptozunun azaldığını gösterir. RSV tedavisi, kadmiyum ile tedavi edilen böbreklerde fosforile ERK1 / 2 protein seviyesini önemli ölçüde azalttı (320) (Tablo-7).

Kronik böbrek hastalığı sıçan modeli olan 5/6 nefrektomize Sprague-Dawley sıçanlarının 4 hafta süreyle RSV (20 mg/kg/gün) ile tedavisi, azalmış mezangial hücre proliferasyonu ve glomerül matriks genişlemesi ile birlikte

atenüe glomerüler hasarla sonuçlandı (319). Böbrek TGF- β protein seviyeleri, RSV tedavisi ile önemli ölçüde azaldı. Renal korteks mitokondriyal elektron taşıma zinciri proteinleri, ATP sentaz B ve sitokrom c oksidaz alt birim I (COX I), RSV tedavisi ile protein seviyeleri artarken, ROS üretimi azaldı (319). Ek olarak, RSV tedavisi böbrek korteks ATP üretimini ve mitokondriyal kompleks I ve III enzimatik aktivitesini arttırdı. Optik atrofi 1 (Opa1) ve mitofusin 2 (Mfn2) protein düzeylerinin artması ve fizyon dinaminle ilişkili protein 1 (Dnp1) protein düzeylerinin azalması nedeniyle RSV tedavisi ile birlikte mitokondriyal füzyon tercih edildi (319) (Tablo-7).

Liu ve ark. böbrek hasarlı (UUO) C57BL/6 farelerinin 2 hafta boyunca RSV (25 mg/kg/gün) ile tedavisi serum kreatinin düzeylerinin ve böbrek α -SMA, snail proteini ve fibronektin protein düzeylerinin azalmasına neden oldu (321) (Tablo-7). RSV ile tedavi edilen hayvanların böbreklerinde tübüler lezyon skoru ve interstisyel kollajen birikimi önemli ölçüde azaldı. Bu, düşük (25 mg/kg/gün) RSV tedavisi ile renal fibrozun kısmen azaldığını gösteren SIRT1 up-regülasyonu ve azalmış fosforile Smad3 ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık, yüksek dozda bir RSV (100 mg/kg/gün), artmış böbrek α -SMA ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü (TFAM) ekspresyonu ile ilişkili ağırlaştırılmış renal fibrozis ile sonuçlanmıştır (321). Bu veriler, yüksek dozlarda RSV'nin pro-fibrotik etkiler gösterebileceğini ve nefroprotektif etkiler uygulayan potansiyel RSV konsantrasyonlarını ve potansiyel nefrotoksisiteye sahip olabilecekleri araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Benzer bir randomize, kontrollü çalışmada, T2DM hastalarında 4 ay boyunca RSV (250 mg/gün) uygulaması (3 yıllık T2DM süresi ve minimum 6 ay oral hipoglisemik tedavi) total kolesterol ve trigliserit seviyelerinde düşmeyle beraber lipid profilinde önemli ölçüde iyileşme ile sonuçlanmıştır (326). Serum kreatinin, üre nitrojen seviyeleri ve total protein atılımı, RSV tedavisi ile azalmıştır, bu da böbrek fonksiyonunun iyileştiğini düşündürmektedir (326). Bu çalışmalar (326-327) T2DM ve bozulmuş böbrek fonksiyonu olan bireylerin RSV ile tedavisinin daha iyi glukoz, insülin ve lipid

homeostazıyla ve daha iyi böbrek fonksiyonuyla sonuçlandığını göstermektedir.

Tablo-7: Resveratrol'ün böbrek üzerine etkileri (321-324, 326, 328, 329)

Hücre	Etki
Fare podositi	↓Albümin geçirgenliği ↓Podosit ölümü ↑E-kadherin ekspresyonu ↑P-kadherin, ZO-1 ve NEPH1 proteini ↓ α -SMA proteini
İmmortal podosit	↓Yüksek glikoz kaynaklı • Mitokondriyal stres • mROS üretimi • Cyto C ve diablo salınımı ↑Kompleks I ve III aktiviteleri ↑Mitokondriyal membran potansiyeli ↑SIRT1, PGC-1 α , NRF1, TFAM mRNA ve protein
CRL-2573 hücreleri	↓Yüksek glikoz kaynaklı • P38 MAPK aktivasyonu • TGF-β1 ifadesi • Fibronektin
SV40 MES 13 hücreleri	↓TGF- β 1 ile indüklenen ROS üretimi ↑TGF- β 1 ile indüklenen • Mitokondriyal membran potansiyeli • ATP • Kompleks I/III aktivitesi • NDUFB8 ve ATP β proteini • SIRT1 • PGC-1α deasetilasyonu
TCMK-1 hücreleri	↓Kadmiyum kaynaklı apoptoz ↓mROS üretimi ↑mSIRT3 proteini ve aktivitesi ↑PGC-1 α ve SOD2 mRNA
HK-2 hücreleri	5–20 μM RSV: ↓TGF- β ile indüklenen EMT ↓Sitotoksiste ↑SIRT1 ve E-kadherin proteini ↓ α -SMA ve fibronektin proteini ↓Ph-Smad3

	↓SIRT1-Smad3/4 40 µM RSV: ↑Sitotoksosite ↑mtROS salınımı ↑Bax, fibronektin ve α-SMA proteini ↓Bcl-2 proteini ↓ATP üretimi ↓PGC-1α ve TFAM proteini
5/6 Nefrektomize Sprague-Dawley sıçanları	↓Mesangial hücre proliferasyonu ↓Glomerül matriks genişlemesi ↓TGF-β ↑ATP üretimi ↓ROS üretimi ↑Karmaşık I ve III'ün aktiviteleri ↑ATP sentaz B ↑COX I, Opa1, Mfn2 ↓Drp1
C57BL/6 fareler	25 mg/kg RSV: ↓Renal fibrozis ↓Tübüler lezyon skoru ↓İnterstisyel kollajen birikimi ↓α-SMA proteini ↓Snail proteini ↓Fibronektin proteini ↑SIRT1 ↓Phospho-Smad3 100 mg/kg RSV: ↑Renal fibrozis ↑α-SMA ve TFAM
Kunming fareleri	↓Apoptoz ↓Kaspaz-3 aktivitesi ↓Bax proteini ↓ERK1/2 proteini ↓BUN seviyeleri ↓Kreatinin seviyeleri
T2DM hastaları	↑Böbrek fonksiyonu ↓Kolesterol seviyeleri ↓Trigliserit seviyeleri ↓Serum kreatinin ↓Toplam protein atılımı ↓Üre nitrojen seviyeleri
Caki-1 ve 786-0 hücreleri	↑Apoptoz ↓Hayatta kalma ↓Göç ↓STAT3 ve STAT5 aktivasyonu ↑PTPε ve SHP-2 proteini ↓JAK1, JAK2 ve c-Src proteini ↓Bcl-2, bcl-xL, survivin, IAP-1 ve IAP-2 proteini ↑Kaspaz -3 protein

EMT: epitelyalden mezenkimal geçiş; **TFAM:** mitokondriyal transkripsiyon faktörü A; **Bcl-xL:** B hücreli lenfoma-çok büyük; **Bax:** Bcl-2 ile ilişkili X; **Bak proteini:** BCL2-antagonisti/öldürücü protein; **α-SMA:** α-düz kas aktin **T2DM:** tip 2 diabetes mellitus. **ERK1/2:** hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar 1/2; **c-Src:** proto-onkogen tirozin-protein kinaz Src; **ROS:** reaktif oksijen türleri; **SIRT1:** sirtuin 1; **JNK:** c-Jun N-terminal kinaz; **PAI-1:** plazminojen aktivatör inhibitörü 1; **MAPK:** mitojenle aktive olan protein kinaz; **TGF-21:**

dönüştürücü büyüme faktörü-21; **ATP**: adenosin trifosfat; **PGC-1 α** : peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör gama koaktivatörü; **AMPKa**: AMP ile aktive olan protein kinaz alfa; **MCP-1**: monosit kemoatraktan protein 1; **mROS**: mitokondriyal ROS; **ZO-1**: zonula okludens-1; **NEPH1**: IRRE benzeri protein 1; **IL**: interlekin; **MKP-1**: MAP kinaz fosfataz-1.

IV. Metformin

Metformin, güvenliği ve düşük maliyeti nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir biguanid ilacıdır. Plazma glikoz seviyelerini düşürme konusundaki olağanüstü yeteneği nedeniyle, tip 2 diyabetin erken evrelerinde tedavi edilmesi için 60 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır (328).

Çalışmalar, metforminin kanser (329-330), kardiyovasküler hastalık (331), karaciğer hastalıkları (332), obezite (11), nörodejeneratif hastalıklar (333) ve böbrek hastalıkları (334) üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu göstermiştir. Tek başına ilaç veya diğer ilaçlarla kombinasyon tedavisinin farklı hastalıkları tedavi etmede etkili olduğu gösterilmiştir (328).

Metforminin renal koruyucu etkileri, gentamisin tarafından indüklenen akut böbrek hasarı (AKI) (335) ve 5/6 nefrektomi kullanan CKD (336), tek taraflı üreteral gibi çoklu hastalık modellerinde gösterilmiştir.

Antidiyabetik ilaç metformin, endotel hücrelerinde oksidatif stresin neden olduğu apoptozu azaltabilir ve diyabetik olmayan hastalarda bile vasküler disfonksiyonu önleyebilir (335).

Ortaya çıkan kanıtlar, metforminin böbrekteki birçok faktörün neden olduğu endoplazmik retikulum (ER) stresine karşı koruyucu rolünü göstermektedir (337-339). Lee ve arkadaşları (338) tarafından yapılan bir çalışmada, insan proksimal tübüler hücrelerinde albümin kaynaklı ER stresinin, reaktif oksijen türleri-Src Kinaz-mTOR yolu aracılığıyla aracılık ettiği gösterilmiştir. Çalışma ayrıca metforminin albümin tarafından indüklenen ER stresini ve kaspaz 3-bağımlı apoptozu azalttığını ve böylece proksimal tübüler hücrelerde tübülointerstisyel hasarı azalttığını göstermiştir (338).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma deneysel olarak adriamisin ile NS oluşturulmuş sıçanlar kullanılarak gerçekleştirildi. Projemiz için Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan onay alındı (30.11.2021 tarih / karar no: 2021-15/18) Tüm hayvan deneyleri, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Komitesi tarafından onaylanan ve Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımına İlişkin NIH Kılavuzuna uygun olarak yapıldı. Sıçanlarda adriamisin ile NS oluşturulma modeli daha önce literatürde tanımlanmış ve sıkça kullanılan bir araştırma modelidir (135,340). Adriamisin enjeksiyonu ile birlikte iki gruba (Grup 2 ve 3) sırası ile 4 haftalık resveratrol ve metformin tedavileri uygulandı. Böylelikle deney süresi toplam altı hafta olarak tamamlandı. Çalışma sırasında kullanılan resveratrol (Donotage firmasından temin edildi) ve metformin (İlko ilaç firmasından temin edildi) bilimsel araştırma amacı ile üretilmiş saf etken maddeler olarak temin edildi. Çalışma grupları; ağırlıkları 250-350 gram, yaşları 12-16 hafta arasında değişen dişi, wistar albino türü sıçanlardan oluşturuldu. Bunlardan rastgele seçilen 12'u kontrol grubu (Grup 4) olarak izlendi, 36'sında ise adriamisin hidroklorür distile su ile sulandırılarak intraperitoneal 10 mg/kg tek doz uygulanarak nefrotik sendrom oluşturuldu (134). Adriamisin uygulamasından 15 gün sonra 36 sıçan rasgele 3 gruba ayrıldı. Grup 1 (Adriamisin grubu): Nefrotik sendrom oluşturulan bu gruptaki sıçanlar standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendi ve bu gruptaki sıçanlara başkaca bir işlem veya tedavi yapılmadı. Bir sıçan deney sırasında öldü. Bu gruptaki toplam 11 sıçan 2,4 ve 6. haftalarda literatürde daha önce uygulandığı şekilde 5 saat süre ile metabolik kafeslere alınarak, idrar protein ölçümlerinde kullanılmak üzere, spot İdrar örnekleri toplandı. Literatür bilgilerine uygun olarak adriamisin uygulamasından 6 hafta sonra deney sonlandırıldı (sevofloran %4-8 inhale ile) (341). İntrakardiyak 5 mm kan örneği ve böbrek dokusu alındı. Deneyin toplam süresi 6 hafta olarak belirlendi. Sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsüne sahip, sıcaklık kontrollü bir odada gözlemlendi. Böbrek

doku lizatı (homogenat), idrar ve kan örnekleri çalışılncaya kadar -20 °C'de saklandı. Grup 2 (Adriamisin + Resveratrol grubu): Adriamisin uygulanmasından 15 gün sonra standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların suyuna resveratrol 40 mg/kg/gün (%0,3 carboxymetil celluloz ile dilue edilmiş) olarak katıldı (306) ve bu tedaviye 4 hafta boyunca devam edildi. Bu gruptaki sıçanlardan 4'ü deney sırasında öldü. Bu gruptaki toplam 8 sıçan 2,4 ve 6. haftalarda literatürde daha önce uygulandığı şekilde 5 saat süre ile metabolik kafeslere alınarak, idrar protein ve kreatinin ölçümlerinde kullanılmak üzere, spot İdrar örnekleri toplandı. Literatür bilgilerine uygun olarak adriamisin uygulamasından 6 hafta sonra deney sonlandırılarak (sevofloran %4-8 inhaler ile) intrakadiyak 5 mm kan örneği ve böbrek dokusu alındı (342). Deneyin toplam süresi 6 hafta olarak belirlendi. Sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsüne sahip, sıcaklık kontrollü bir odada gözlemlendi. Böbrek doku lizatı (homogenat), idrar ve kan örnekleri çalışılncaya kadar -20 °C'de saklandı. Grup 3 (Adriamisin + metformin grubu): Adriamisin uygulanmasından 15 gün sonra standart sıçan yemi ile beslenen sıçanların suyuna metformin 100 mg/kg/gün olarak katılacak ve bu tedavi 4 hafta sürdürüldü (335). Bu gruptaki sıçanlardan 5'i deney sırasında öldü. Bu gruptaki toplam 7 sıçan 2,4 ve 6. haftalarda literatürde daha önce uygulandığı şekilde 5 saat süre ile metabolik kafeslere alınarak, idrar protein ve kreatinin ölçümlerinde kullanılmak üzere, spot İdrar örnekleri toplandı. Literatür bilgilerine uygun olarak adriamisin uygulamasından 4 hafta sonra (6. haftada) deney sonlandırılarak (sevofloran %4-8 inhaler ile) intrakadiyak 5 mm kan örneği ve böbrek dokusu alındı. Deneyin toplam süresi 6 hafta olarak belirlendi. Sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsüne sahip, sıcaklık kontrollü bir odada gözlemlendi. Böbrek doku lizatı (homogenat), idrar ve kan örnekleri çalışılncaya kadar -20 °C'de saklandı. Tüm sıçanlardan intrakardiak 5 ml kan örneği alınarak 4000 devirde 4 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri ayrıldı ve örnekler çalışılncaya kadar -80 °C'de saklandı. Grup 4 (Kontrol grubu) n= 10: Sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsüne sahip, sıcaklık kontrollü bir odada gözlemlendi ve standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendi. Bu grupta yer alan sıçanlara

çalışma süresince herhangi bir işlem veya tedavi yapılmadı. Bu gruptaki sıçanlar 2,4 ve 6. haftalarda literatürde daha önce uygulandığı şekilde 5 saat süre ile metabolik kafeslere alınarak, idrar protein ölçümlerinde kullanılmak üzere, spot İdrar örnekleri toplandı. Deney başladıktan 6 hafta sonra sevofloran %4-8 inhaler anestezi ile deney sonlandırıldı. Bu gruptaki sıçanlardan da intrakardiyak 5 ml kan ve böbrek dokusu alındı. Böbrek dokuları, idrar ve kan örnekleri ölçümler yapılincaya kadar -20 °C'de saklandı. Kan örneklerinde otoanalizör kullanılarak kreatinin, BUN, albümin, total kolesterol, trigliserid; spot idrar örneklerinde ise protein ve kreatinin değerleri ölçüldü. Biyokimyasal analizler biyokimya laboratuvarında Roche Modular cihazında (serum ve idrar kreatinin Jaffe; kreatinin, BUN, trigliserid ve total kolesterol enzimatik kalorimetrik; total protein ve albümin BCG end point kalorimetrik; idrar proteini ise turbidimetrik yöntemlerle ölçüldü. Böbrek doku örneklerinden ultrasonik parçalayıcı ile doku lizatı elde edildi. Bu lizattan üreticinin talimatlarına göre Kaspaz-3, XIAP, Survivin ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü (Farmasina, İstanbul, Türkiye). ELISA için böbrek dokusunun hazırlanması: Böbrek dokuları yüzey kanını ve iç kalıntıları gidermek için önceden +4 C'ye soğutulmuş ticari PBS solüsyonu (fosfat tamponlu salin) ile yıkandı. Tartılan böbrek dokuları buz üzerinde ince parçalara kesildi, tüplere aktararak üzerine proteaz inhibitörü içeren PBS solüsyonu eklendi. PBS solüsyonu 9 cc/1 gr böbrek dokusu olarak; proteaz kokteyli de 10 µL/1 cc PBS solüsyonu olacak şekilde böbrek dokuları üzerine eklenerek hiçbir doku parçası kalmayana kadar yüksek hızda birkaç dakika homojenizasyonları sağlandı. Örnekler homojenizasyondan sonra 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Ardından, hücrelerin tamamen erimesini sağlamak ve örneklerin viskozitesini azaltmak için örnekler buz üzerinde tutularak 2 dakika sonikasyon işlemi yapıldı (her döngü için 10 saniyelik sonikasyon/10 saniye dinlenme periyotlarında). Ardından örnekler 5000 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj edilip süpernatantlar elde edildi. Pelet kısmı atıldı. Çalışmadaki ölçümler yapılincaya kadar lizatlar -20°C'de saklandı (343). Anti apoptotik proteinlerin ölçümü ticari olarak elde edilen standart direkt sandwich ELISA yöntemi ile yapıldı [Mikrotitre plaka kuyuları kaplama

tamponu içinde 1-10 µg/ml arasında bir konsantrasyonda, uygun kaplama antikorunun 100 µl'si ile kaplandı. Plaka inkübe edildi ve yıkama tamponunda 3 kez yıkandı. Her kuyucuğa 150 µl blokaj solüsyonu eklendi ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi, yıkama tamponunda 4 kez yıkandı. Numuneler ve standartları yıkama tamponunda seyreltildi ve ilgili kuyulara 100 µl uygun şekilde seyreltilmiş numuneler ve standartlar eklendi, 37°C'de 90 dakika inkübe edildi ve yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µl uygun şekilde seyreltilmiş enzim konjuge tespit antikoruna eklendi, 37°C'de 1 saat inkübe edildi ve yıkandı. Her kuyucuğa 100 µl uygun substrat solüsyonu eklendi, oda sıcaklığında 30 dakika veya istenen renk değişimi elde edilene kadar inkübe edildi. 450 nanometrede absorbans değerleri okundu. Böbrek doku örneklerinden yapılacak patolojik incelemeler ile gruplar arasındaki farklar saptandı ve uygulanan resveratrol ve metformin tedavilerinin patolojik değişimlere yansımaları belirlendi. Bu amaçla her bir deney grubundaki sıçanlara ait böbrek dokuları formaldehit içinde laboratuvara ulaştırıldı ve bu dokulardan ışık mikroskopik inceleme için kortikal ve medüller bölgeyi içerecek şekilde, deney sıçanı başına böbreğin bir kesit yüzeyi örnekledi. Örneklenen parça doku takip cihazında çeşitli aşamalardan geçtikten sonra rutin laboratuvarda 2 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlere Hematoksilen&Eozin boyamasından sonra lam lamel arası preparatlar elde edildi. Hematoksilen&Eozin ve PAS boyamalarının yapılması ile patolojik incelemede 4 komponentin değerlendirildi: Glomerüler yapı (glomerüllerde bazal membran kalınlaşması, mezanşimal genişleme, global ya da segmental skleroz ve hücresel artış), Tübüler yapı (tübüllerde atrofi varlığı, tübül hücrelerinde dejeneratif değişikliklerin varlığı, tübül lümenlerinde proteinöz birikim), İnterstisyel yapı (fibrozis varlığı ve inflamasyon varlığı) ve Damarlar (hiyalinizasyon varlığı ve intimal fibrozis varlığı). Böbrek doku örneklerinde incelenen parametrelerin her birinin varlığı, değişim yok (sıfır puan) %0-25 (1 puan), %25-50 (2 puan), %50-75 (3 puan) ve >%75 üstü (4 puan) olarak skorlandı. Elde edilen skorlarla deney grupları karşılaştırıldı. Kantitatif başkaca bir değerlendirme yapılmadı. Deney gruplarından elde edilen verilerin istatistiksel analizi Biyoistatistik Ana Bilim Dalı'nda SPSS

programı (versiyon 23) kullanılarak yapıldı. Dağılımları normal olmayan grupların karşılaştırılması için non parametrik Kruskal-Wallis testi, dağılımları normal olan çoklu grupların analizinde ise ANOVA testi kullanıldı. Korelasyon analizleri için nonparametrik Spearman testi uygulandı. Belirli bir veriye etkili değişkeni saptamak amacı ile ANOVA testi anlamlı olmak üzere linneer regresyon (Forward Stepwise modeli) analizi yapıldı. Bir gruba ait zmanasal değişimi belirlemek için Wilcoxon testi yapıldı. $P<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



BULGULAR

Bu çalışmaya Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Bilimler Deneyisel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yaşları 12-14 hafta arasında, ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen, dişi Wistar-Albino türü 36 sıçan dahil edildi. Bunlardan rastgele seçilen 10'u kontrol grubu (Grup 4) olarak izlendi, 26'sında ise adriamisin hidroklorür distile su ile sulandırılarak intraperitoneal 10 mg/kg tek doz uygulanarak nefrotik sendrom oluşturuldu. Nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlar standart sıçan yemi ile beslendikten 2 hafta sonra rastgele 3 gruba (Grup 1/Adriamisin Grubu, Grup 2/Resveratrol Grubu ve Grup 3/Metformin grubu) ayrıldı.

Nefrotik sendromlu gruptaki sıçanların serum albümin değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu (sırasıyla; 19,8 [14,1-22,1] g/dl, 17,9 [16,5-21,6] g/dl, 19,9 [18,5-24,2] g/dl, 26,7 [25,5-28,2] g/dl, $p=0,0001$). Serum kreatinin düzeyleri (sırasıyla; 0,37 [0,29-0,43] mg/dl, 0,35 [0,3-0,41] mg/dl, 0,4 [0,31-0,43] mg/dl, 0,35 [0,33-0,38] mg/dl, $p>0,05$), serum total protein düzeyleri (sırasıyla; 54,3 [38-63,1] g/L, 55,75 [50,2-66,5] g/L, 61,5 [55,7-67,5] g/L, 63,4 [55,5-67,7] g/L, $p>0,05$) ve serum kan üre azotu (BUN) düzeyleri (sırasıyla; 20 [17-42,5] g/L, 25 [19-46,5] g/L, 21 [15,5-27] g/L, 20,5 [17,5-27,5] g/L, $p>0,05$) açısından çalışma grupları arasında fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 8).

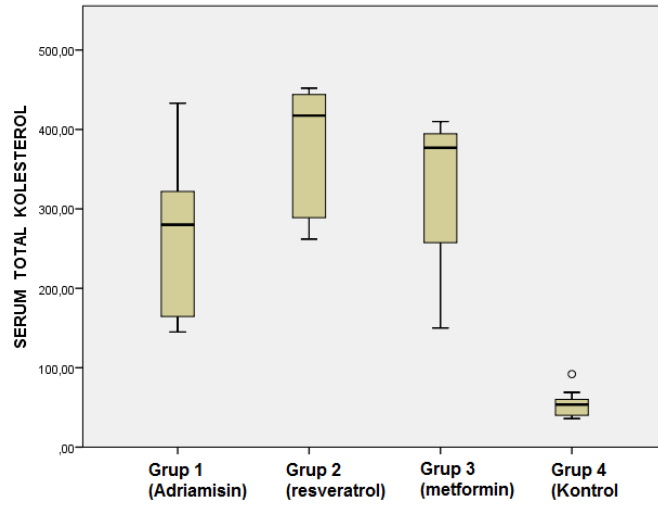
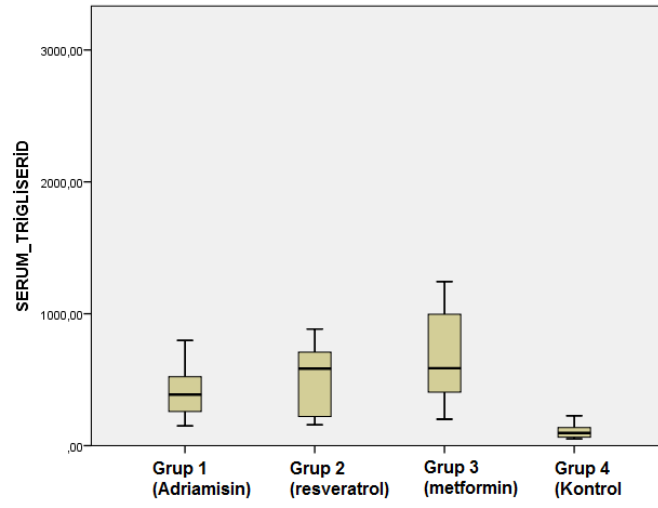
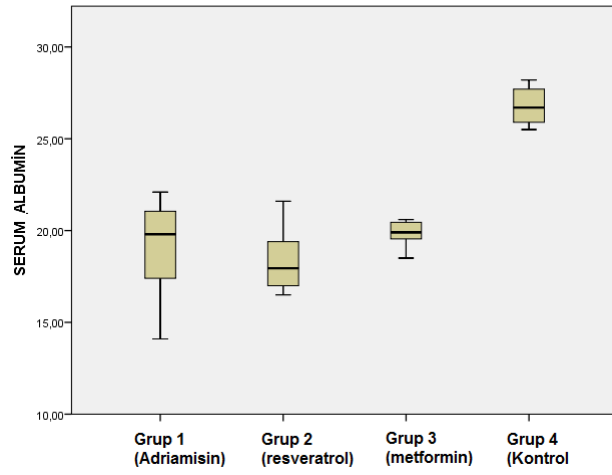
Nefrotik sendromlu gruptaki sıçanların serum HDL değerleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla; 170,6 [91,7-242,5] mg/dl, 236,3 [177,5-287,3] mg/dl, 179,6 [75,1-256,5] mg/dl, 42,2 [21,5-73] mg/dl, $p=0,0001$. Resveratrol grubu serum HDL düzeyi adriamisin grubuna göre belirgin yüksek bulundu (sırasıyla; 170,6 [91,7-242,5] mg/dl, 236,3 [177,5-287,3] mg/dl, $p=0,018$). Serum total kolesterol düzeyleri (sırasıyla; 280 [145-433] mg/dL, 417,5 [262-452] mg/dL, 377 [150-410] mg/dL, 53,5 [36-92] mg/dL, $p>0,05$) ve serum trigliserid düzeyleri (sırasıyla; 387 [150-798] mg/dL, 584,5 [158-883] mg/dL, 587 [200-2671] mg/dL, 95,5 [52-226] mg/dL, $p>0,05$) açısından çalışma grupları arasında fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 8).

Tablo-8. Çalışma gruplarının biyokimya sonuçları.

	Grup 1 (Adriamisin) (n=11)	Grup 2 (Resveratrol) (n=8)	Grup 3 (Metformin) (n=7)	Grup 4 (Kontrol) (n=10)	P
Kreatinin	0,37 (0,29-0,43)	0,35 (0,3-0,41)	0,4 (0,31-0,43)	0,35 (0,33-0,38)	NS
Kan üre azotu	20 (17-42,5)	25 (19-46,5)	21 (15,5-27)	20,5 (17,5-27,5)	NS
Albumin	19,8 (14,1-22,1)	17,95 (16,5-21,6)	19,9 (18,5-24,2)	26,7 (25,5-28,2)	P1= ,006 P2= ,0001 P3= ,0001 P4=NS P5=NS P6=0,001
Total Protein	54,3 (38-63,1)	55,75 (50,2-66,5)	61,5 (55,7-67,5)	63,4 (55,5-67,7)	P1=NS P2=0,003 P3=0 ,032 P4=0 ,009 P5=NS P6=NS
Total Kolesterol	280 (145-433)	417,5 (262-452)	377 (150-410)	53,5 (36-92)	P1=0,001 P2=0,002 P3=0,0001 P4=NS P5=NS P6=NS
Trigliserid	387 (150-798)	584,5 (158-883)	587 (200-2671)	95,5 (52-226)	P1=0,001 P2=0,002 P3=0,0001 P4=NS P5=NS P6=0,001
HDL	170,6 (91,7-242,5)	236,3 (177,5-287,3)	179,6 (75,1-256,5)	42,2 (21,5-73)	P1=0,001 P2=0,001 P3=0,0001 P4=NS P5=NS P6=NS

Sonuçlar ortanca olarak ifade edildi. P1: Metformin ve kontrol grubu arasında, P2: Adriamisin ve kontrol grubu arasında, P3: Resveratrol ve kontrol grubu arasında, P4: Metformin ve adriamisin grubu arasında, P5: Metformin ve resveratrol grubu arasında, P6: Adriamisin ve resveratrol grubu arasında. P değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi.

Adriamisin uygulanmasını takip eden ikinci haftada çalışma gruplarındaki idrar protein düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu (Tablo 9, Şekil 9). İkinci haftada, Grup 2'deki sıçanların idrar protein düzeyleri Grup 1'deki sıçanlara göre daha fazla artış gösterdi (Tablo 9, p=0.001).



Şekil-8: Grup 1,2 ve 3'te serum albümin, total kolesterol ve trigliserid değerleri benzer, kontrol grubuna göre yüksekti ($p < 0.05$)

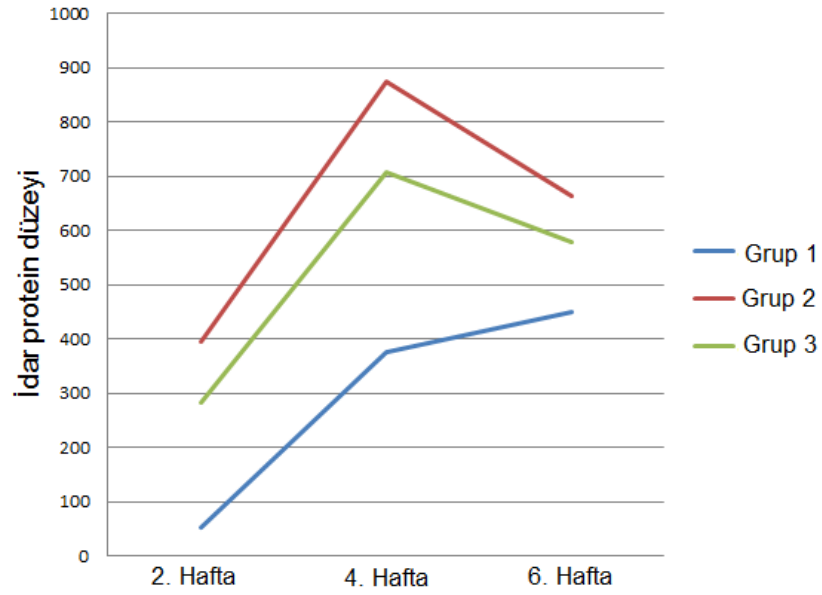
Adriamisin uygulanmasını takip eden dördüncü haftada da çalışma gruplarındaki idrar protein düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksekti (Tablo 9, Şekil 9). Dördüncü haftada Grup 2'deki (resveratrol) sıçanların idrar protein düzeyleri Grup 1'deki (adriamisin) sıçanların idrar protein düzeylerinden daha yüksek bulundu (Tablo 9, $p=0.001$).

Tablo 9. Çalışma gruplarının spot idrar protein düzeyleri (mg/dL).

	Grup 1 (Adriamisin) (n=11)	Grup 2 (Resveratrol) (n=8)	Grup 3 (Metformin) (n=7)	Grup 4 (Kontrol) (n=10)	P
İkinci hafta idrar protein (mg/dL)	52,4	395,4	282,2	7,7	P1=0,0001 P2=0,021 P3=0,0001 P4=NS P5=NS P6=0,001
Dördüncü hafta idrar protein (mg/dL)	376	874,6	708,4		P1=0,0001 P2=0,019 P3=0,0001 P4=NS P5=NS P6=0,001
Altıncı hafta idrar protein (mg/dL)	449,3	663,4	577,9		P1=NS P2=0,0001 P3=0,0001 P4=NS P5=0,001 P6=0,052

Sonuçlar ortanca olarak ifade edildi. P1: Metformin ve kontrol grubu arasında, P2: Adriamisin ve kontrol grubu arasında, P3: Resveratrol ve kontrol grubu arasında, P4: Metformin ve adriamisin grubu arasında, P5: Metformin ve resveratrol grubu arasında, P6: Adriamisin ve resveratrol grubu arasında. P değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi.

Adriamisin uygulanmasını takip eden altıncı haftada ise Grup 2 ve 3'teki sıçanların idrar protein düzeyleri kontrol grubundaki sıçanlara göre yüksek bulundu. Ancak Grup 3'teki sıçanlar (metformin) ile Grup 1 (adriamisin) ve Grup 4 (kontrol grubu) sıçanları arasında idrar protein atımı bakımından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı (sırası ile $p=0.070$ ve $p=0.093$, Tablo 9). Grup 3'te (metformin) bulunan sıçanların idrar protein atımları Grup 2'deki sıçanlara göre daha düşüktü ($p=0.047$, Tablo 9)



Şekil-9: Deney gruplarındaki [Grup 1 (Adriamisin), Grup 2 (resveratrol), ve Grup 3 (metformin)] idrar protein düzeylerinin 2. 4. ve 6. haftadaki değişimleri. Grup 2 ve 3'te, sıçanlarda altıncı haftadaki idrar protein düzeyleri dördüncü haftadaki idrar protein düzeylerine göre anlamlı olarak azaldı.

Grup 2 ve Grup 3'te altıncı hafta gözlenen idrar protein düzeyindeki azalma, dördüncü haftadaki idrar protein düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 8, Wilcoxon test). Grup 2'deki (Resveratrol) sıçanların 6. haftadaki idrar protein düzeyleri (ortanca: 663,4 mg/dL) dördüncü haftaya göre (ortanca: 874,6 mg/dL) anlamlı olarak azalmıştı (Z skor: -2,828 ve $p=0.005$). Benzer şekilde Grup 3'teki sıçanlarda 6. haftada saptanan idrar protein miktarındaki azalma (ortanca: 577,9 mg/dL) 4. haftadaki ölçümlere göre istatistiksel olarak anlamlıydı (ortanca: 708,4 mg/dL) anlamlı olarak azalmıştı (Z skor: -2,646 ve $p=0.008$). Grup 1'deki (adriamisin) sıçanlarda ise, deney süresince ölçülen idrar protein düzeylerinde herhangi bir azalma saptanmadı. Bu grupta, 6. haftada idrar protein atımı (449,3 mg/dL), dördüncü haftadaki (376 mg/dL) ölçümlere göre daha yüksekti ve artış eğilimi devam etmekteydi (Şekil 8, Z skor: -3,317 ve $p=0.001$).

Böbrek dokusunda ölçülen anti apoptotik protein (Sürvin ve XIAP) ve proapoptotik kaspaz-3 düzeyleri Tablo 10 ve Şekil 10-12'de gösterilmiştir.

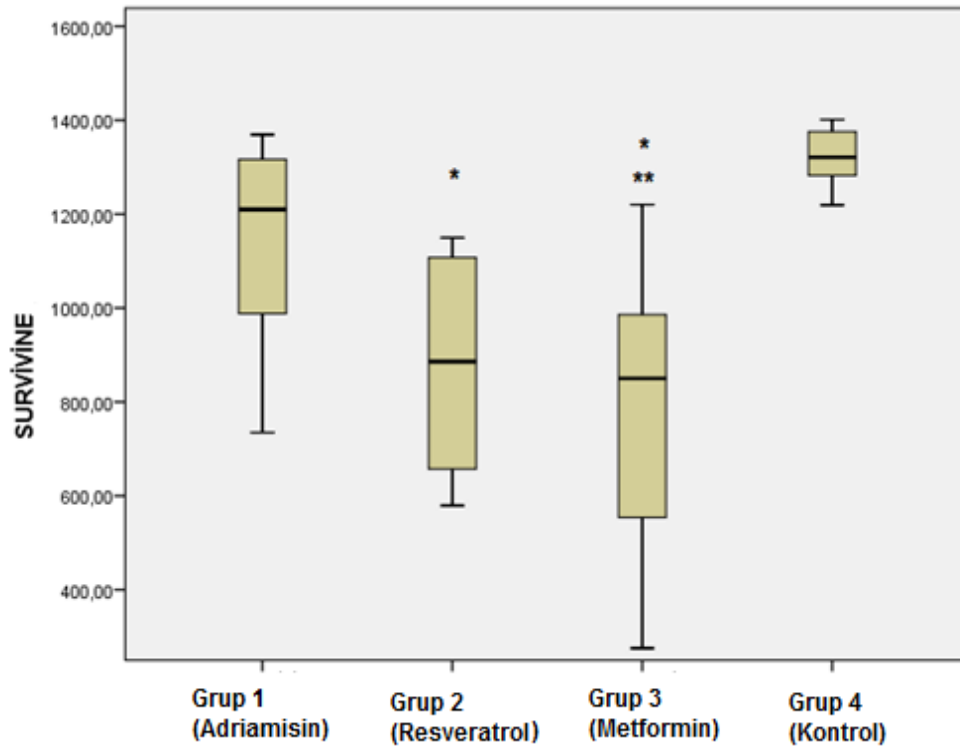
Herhangi bir tedavinin uygulanmadığı Grup 1'deki sıçanlarda doku survivin düzeyi kontrol grubu ile benzerlik gösteriyordu (Tablo 10, $p>0.05$).

Tablo 10. Böbrek dokusu anti apoptotik proteinler (Survivin ve XIAP) ve kaspaz-3 düzeyleri (Median, minimum, maksimum).

	Grup 1 (Adriamisin) (n=11)	Grup 2 (Resveratrol) (n=8)	Grup 3 (Metformin) (n=7)	Grup 4 (Kontrol) (n=10)	p
Survivin (ng/ml)	1210 734,9 1369,2	886 579 1149,5	850,3 275,6 1220,3	1107,1 275,6 1401,1	p1=0.0001 p2= NS p3=0.002 p4=0.038 p5= NS p6= NS
XIAP (Mean±SD) (ng/ml)	17,5±3,2	18,9±3	21±1,7	20,3±2,8	NS
Kaspaz-3 (ng/ml)	48 43,7 48,4	47,8 45,5 48,1	47,3 44,1 48,1	47,9 43,7 48,3	NS

P1: Metformin ve kontrol grubu arasında, P2: Adriamisin ve kontrol grubu arasında, P3: Resveratrol ve kontrol grubu arasında, P4: Metformin ve adriamisin grubu arasında, P5: Metformin ve resveratrol grubu arasında, P6: Adriamisin ve resveratrol grubu arasında. P değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi. NS= $p>0.05$.

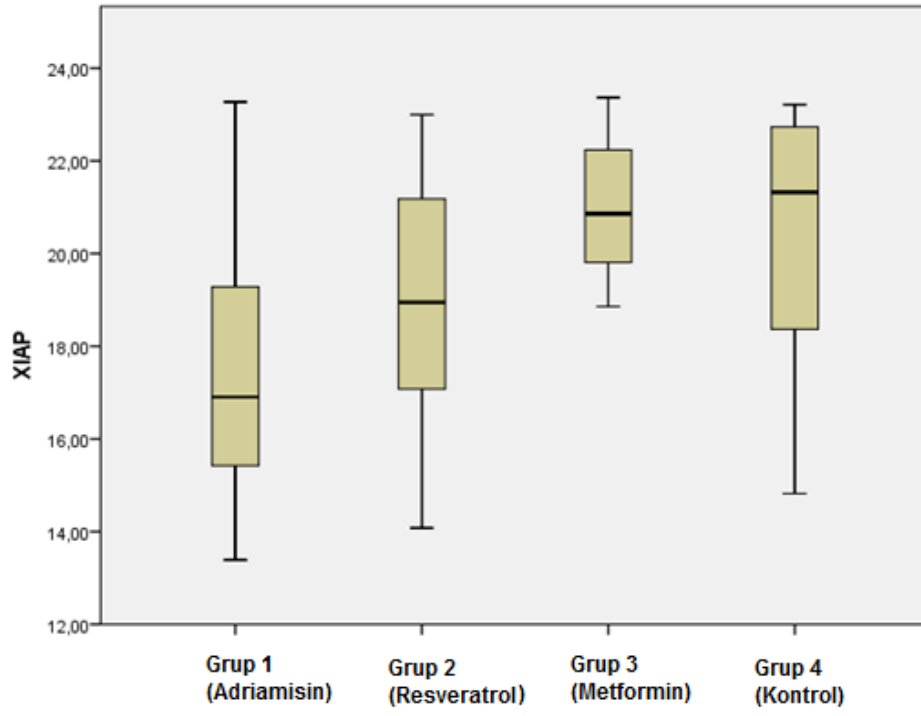
Grup 2 (resveratrol) ve Grup 3 (metformin) gruplarındaki sıçanların böbrek dokusu survivin değerleri kontrol grubundaki sıçanlara göre anlamlı düşük bulundu (sırasıyla; 886 [579-1149,5] ng/ml, 850,3 [275,6-1220,3] ng/ml, 1107,2 [275,6-1401,2] ng/ml, $p<0,05$). Grup 3 (metformin) sıçanların böbrek dokusu survivin değerleri Grup 1'deki (adriamisin) grubundaki sıçanlara göre daha düşüktü (sırasıyla; 850 [275,6-1220,3] ng/ml, 1210 [734,9-1369,2] ng/ml, $p=0,038$) (Tablo 10) (Şekil 10).



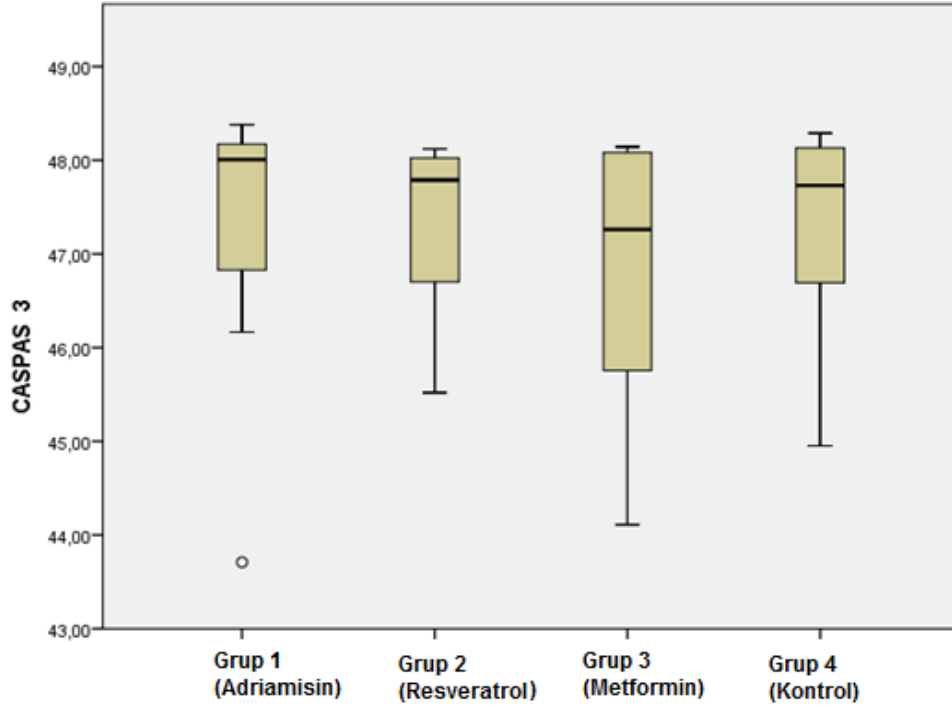
Şekil-10: Resveratrol ve Metformin tedavileri ile böbrek doku sürvinin düzeylerinde azalma saptandı. *Resveratrol vs Kontrol: $p=0.002$; *Metformin vs Kontrol: $p=0.001$; **Metformin vs Adriamisin: $p=0.038$.

Çalışma gruplarındaki (2,3 ve 4) sıçanların böbrek dokusu XIAP düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Grup 1: $17,5 \pm 3,2$ ng/ml; Grup 2: $18,9 \pm 3$ ng/ml; Grup 3: $21 \pm 1,7$ ng/ml; Grup 4: $20,3 \pm 1,7$ ng/ml, $p > 0,05$). Metformin grubundaki sıçanlarda böbrek dokusu XIAP değerleri ($21 \pm 1,7$ ng/ml), resveratrol grubundaki sıçanlarda böbrek dokusu XIAP değerlerine ($18,9 \pm 3$ ng/ml) göre istatistiksel olarak sınırda anlamlı olmak üzere ($p=0.076$) yüksek bulundu (Tablo 10) (Şekil 11).

Çalışma gruplarındaki sıçanların böbrek dokusu kaspaz-3 değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı (sırasıyla; 48 [43,7-48,4] ng/ml, 47,8 [45,52-48,1] ng/ml, 47,3 [44,1-48,1] ng/ml, 47,8 [43,71-48,4] ng/ml, $p > 0,05$) (Tablo 10) (Şekil 12).



Şekil-11: Deney gruplarındaki XIAP renal doku düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$).



Şekil-12: Deney gruplarına ait Kaspaz-3'ün renal doku düzeyleri benzer bulundu ($p>0.05$).

Deney gruplarında ölçülen serum anti apoptotik proteinlerin (Sürvivin ve XIAP) ve proapoptotik serum kaspaz-3 düzeyleri Tablo 11 ve Şekil 12-14'te sunulmuştur.

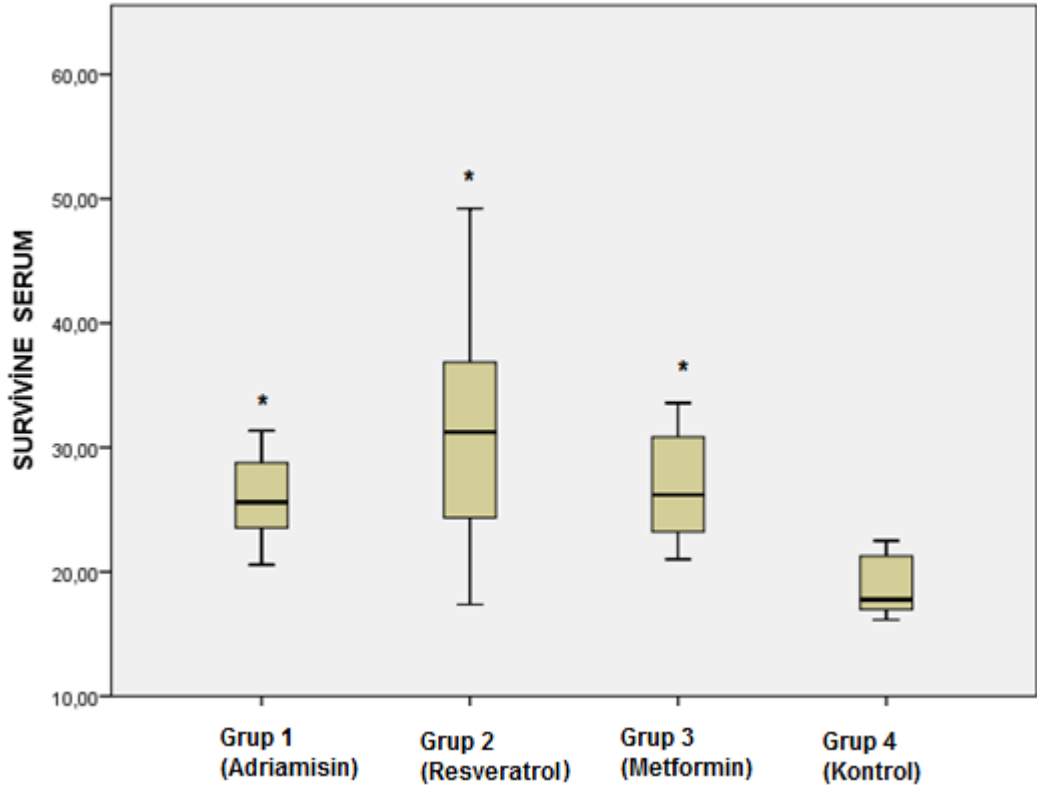
Tablo 11. Serum anti apoptotik protein (Sürvivin ve XIAP) ve kaspaz-3 düzeyleri (Median, minimum, maksimum).

	Grup 1 (Adriamisin) (n=11)	Grup 2 (Resveratro l) (n=8)	Grup 3 (Metformin) (n=7)	Grup 4 (Kontrol) (n=10)	p
Sürvivin	25,6 (20,6-54,8)	31,2 (17,4-49,2)	26,2 (21-33,6)	17,8 (16,1-39)	p1=0.021 p2=0.007 p3=0.003 p4-6= NS
XIAP	9,8 (6,4-23,1)	11,3 (4,4-20,5)	5,8 (3,8-11,5)	2,7 (2-4)	p1=0.018 p2=0.0001 p3=0.0001 p4-6= NS
Kaspaz-3	0,9 (0,7-3,2)	1,4 (0,9-2,4)	1,6 (1,3-1,9)	1,6 (1,2-7,9)	p1=NS p2=0.001 p3=NS p4= 0.012 p5=NS p6=0.04

P1: Metformin ve kontrol grubu arasında, **P2:** Adriamisin ve kontrol grubu arasında, **P3:** Resveratrol ve kontrol grubu arasında, **P4:** Metformin ve adriamisin grubu arasında, **P5:** Metformin ve resveratrol grubu arasında, **P6:** Adriamisin ve resveratrol grubu arasında. P değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi. NS=p>0.05.

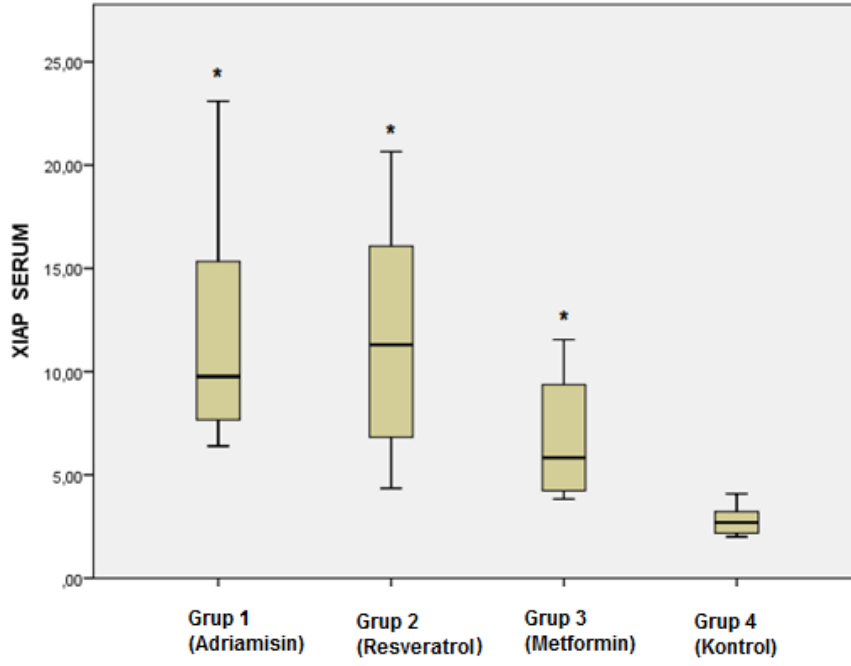
Çalışma gruplarındaki (Grup 1,2 ve 3) sıçanların serum survivin (sırasıyla; 25,6 [20,6-54,8], 31,2 [17,4-49,2] ve 26,2 [21-33,6] ng/ml) ve XIAP ((sırasıyla; 9,8 [6,4-23,1], 11,3 [4,4-20,5] ve 5,8 [3,8-11,5] ng/ml) değerleri, kontrol grubuna (sırası ile 17,8 [16,1-39] ve 2,7 [2-4] ng/ml) göre istatistiksel

olarak anlamlı yüksek ölçüldü ($p<0.05$; Tablo 11, Şekil 12 ve 13). Ancak çalışma grupları arasında serum survivin ve XIAP düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$; Tablo 11, Şekil 13 ve 14).

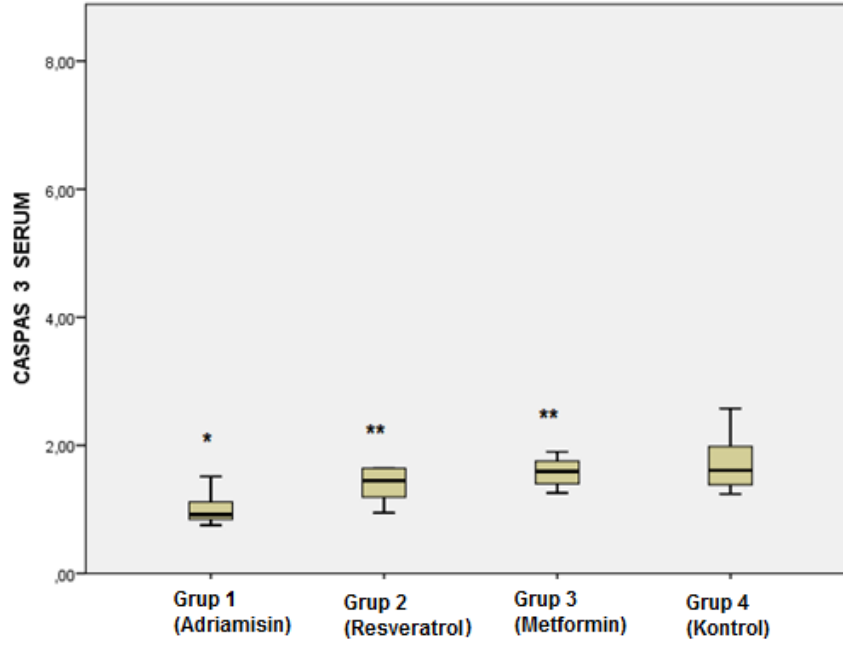


Şekil-13: Deney gruplarında ölçülen survivin düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu (*Adriamisin vs kontrol: $p=0.007$; Resveratrol vs kontrol: $p=0.003$; Metformin vs kontrol: $p=0.021$.).

Grup 1 (adriamisin) serum kazpaz-3 düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük saptandı $[(0,9 (0,7-3,2) / 1,6 (1,2-7,9); p=0.001]$. Resveratrol ve metformin tedavileri ile serum kazpaz-3 düzeyleri Grup 1'e (adriamisin) kıyasla artış gösterdi (sırası ile 1,6 $[1,24-7,9]$; 11,3 $[4,35-20,6]$ ve $[(0,9 (0,7-3,2) \text{ ng/ml}; p<0.05$; Tablo 11, Şekil 14).



Şekil-14: Çalışma gruplarının serum XIAP düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek olarak saptandı. *Adriamisin vs kontrol: $p=0.0001$; Resveratrol vs kontrol: $p=0.0001$; Metformin vs kontrol: $p=0.018$.

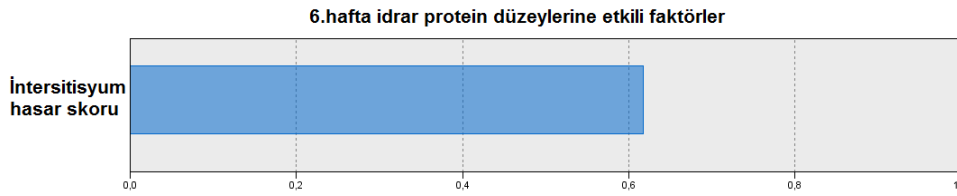
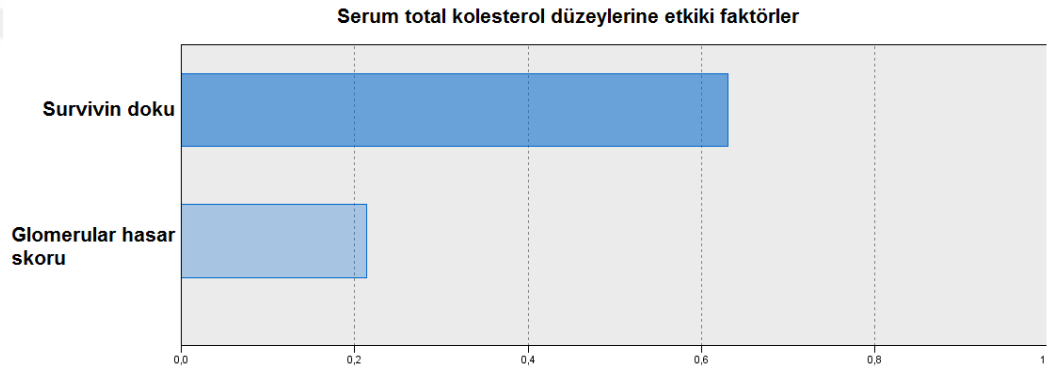
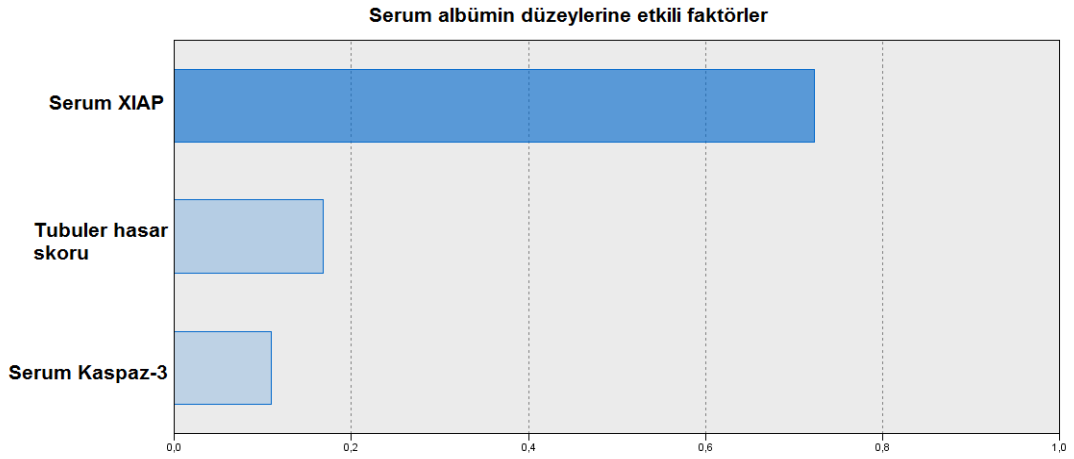


Şekil-15: Deney gruplarında serum Kaspaz-3 düzeylerinin Karşılaştırılması. *Adriamisin vs kontrol: 0.001; **Resveratrol vs adriamisin: 0.040; **Metformin adriamisin: 0.012.

Nefrotik sendrom geliştirilen sıçanlarda yapılan lineer regresyon analiz (Forward Stepwise) sonuçları Tablo-12’de özetlenmiştir. Deneyimizde yapılan ölçümlere göre serum albumin düzeyini etkileyen en önemli etken serum XIAP düzeyleri iken, serum total kolesterol düzeylerini etkileyen en önemli faktör surviving renal doku düzeyleri olmuştur (Şekil 16). Altıncı hafta idrar protein düzeyini belirleyen en önemli faktör ise renal intersitisyel hasar düzeyidir (Tablo 12, Şekil 16).

Tablo 12. Serum albumin, total kolesterol ve 6. hafta idrar protein düzeylerine en fazla etkili olan faktörler.

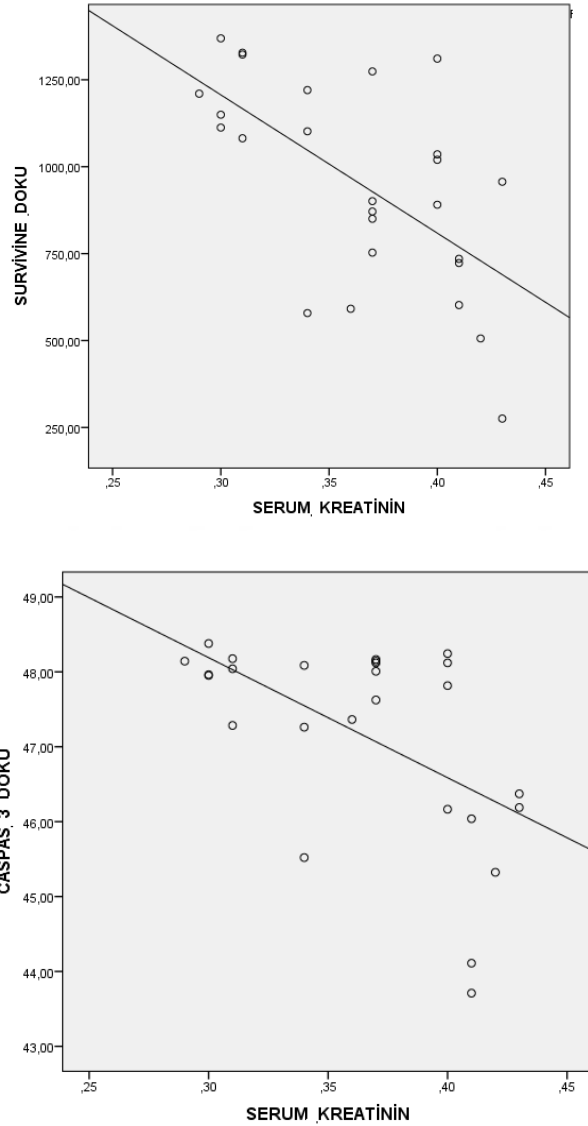
Etkilenen Faktör	Etkileyen Faktörler	R ²	t	p
Albümin	Serum XIAP	0,828	-3,496	0,003
	Tubuler hasar skoru		2,851	0,012
	Serum kaspaz-3		-2,202	,043
Total Kolesterol	Survivin doku düzeyleri	0,752	-3,771	,002
	Glomerular hasar skoru		-2,431	,027
6.hafta idrar protein düzeyi	İntersitisyum hasar skoru	0.675	3,695	,002



Şekil-16: Serum albumin, total kolesterol ve 6. hafta idrar protein düzeylerini etkileyen faktörler (Lineer regresyon analizi, Forward Stepwise metod, $p < 0.05$).

KORELASYON ANALİZLERİ

Adriamisin ile deneysel nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlarda ölçülen ve skorlanan parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı olan korelasyonlar Tablo 13'te gösterilmiştir. Deney grupları arasında serum kreatinin düzeyleri bakımından anlamlı bir fark olmamasına rağmen, nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlarda serum kreatinin düzeyleri ile sürvinin ve kaspaz-3 renal doku düzeyleri arasında negatif bir korelasyon vardı.

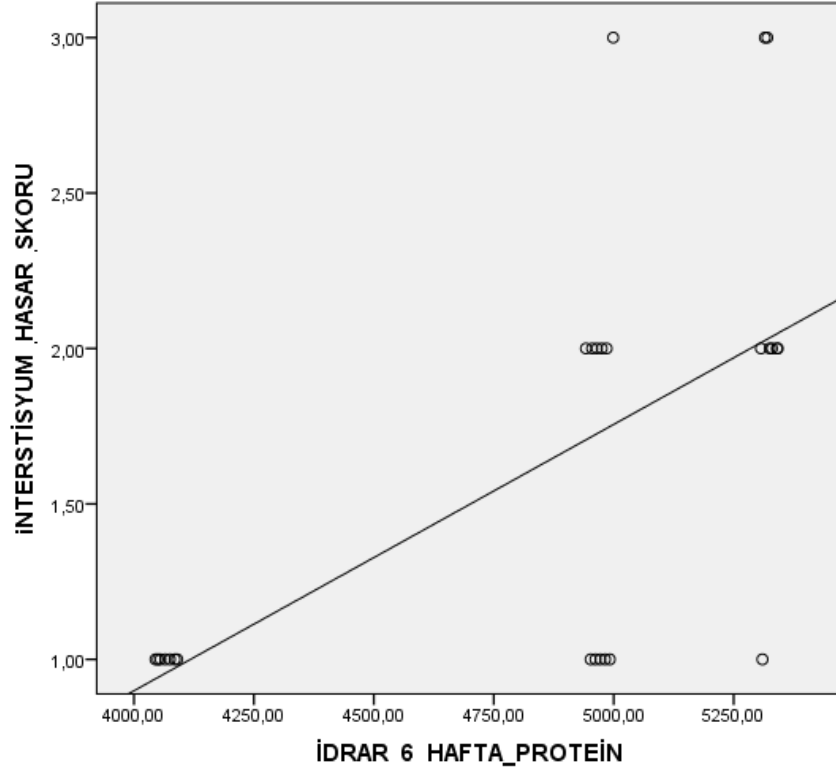


Şekil-17. Nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlarda renal doku kaspaz-3 ve sürvinin düzeylerindeki azalma serum kreatin düzeylerinde artış ile ilişkilidir.

Tablo 13. Deneyisel nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlarda ölçülen / skorlanan parametreler arasındaki korelasyonlar.

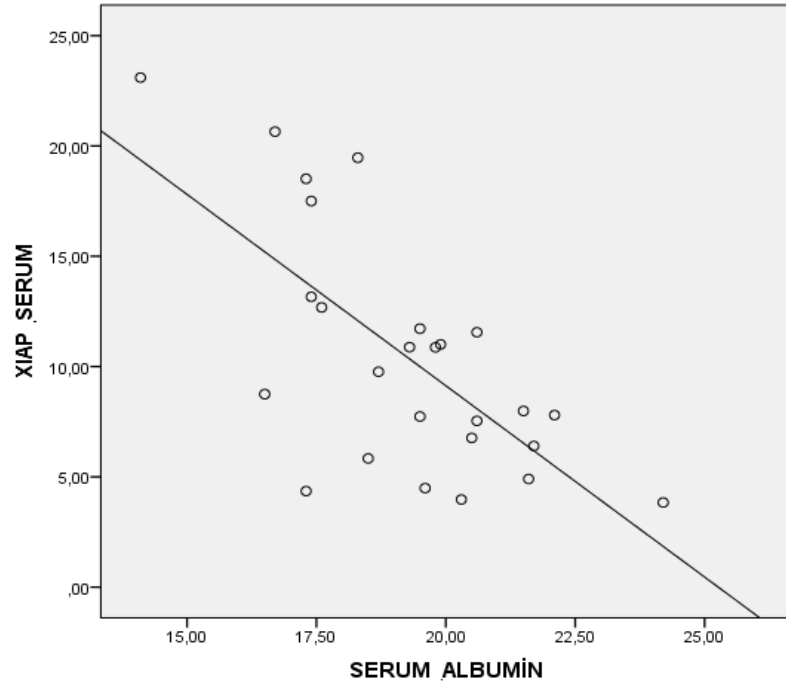
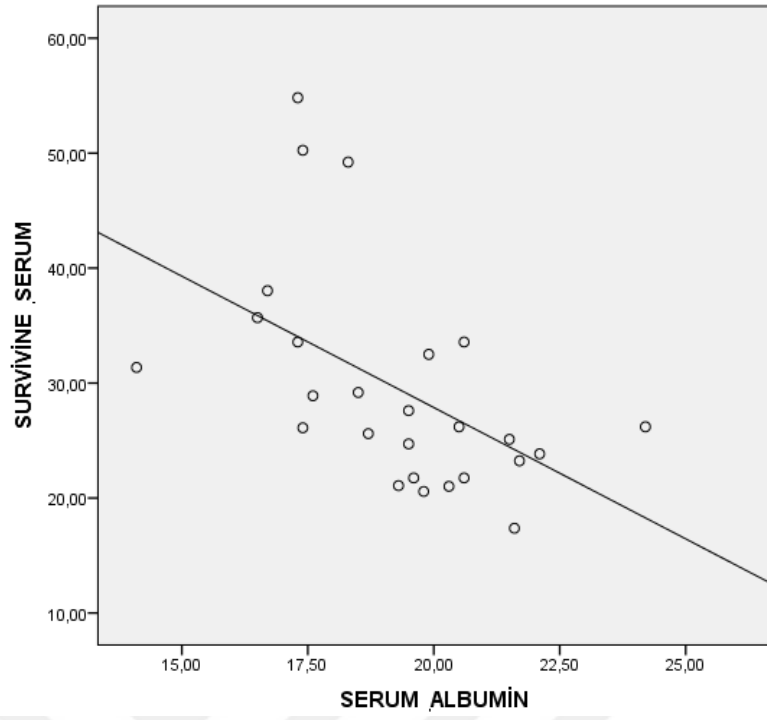
	SURVİVİN E DOKU	SURVİVİN SERUM	XIAP DOKU	XIAP SERUM	KASPAZ-3 DOKU	KASPAZ-3 SERUM	6.HAFTA İDRAR PROTEİ N	S-Cr	SERUM ALBÜMİN	TP	TK	TG	GHS	İHS
	(r / p)	(r / p)	(r / p)	(r / p)	(r / p)	(r / p)	(r / p)	(r / p)	(r / p)	(r / p)	(r / p)	(r / p)	(r / p)	(r / p)
SURVİVİN DOKU		-,440 0,025			,589 0,002			-,625 0,001			-,678 0,001	-,554 0,003		
SURVİVİN SERUM				,556 0,003					-,621 0,001	-,451 0,021	,390 0,049			
XIAP DOKU										,416 0,035				
XIAP SERUM		,556 0,003							-,590 0,001	-,533 0,005				
KASPAZ-3 DOKU	,589 0,002							-,519 0,007						
KASPAZ-3 SERUM													-,435 0,026	
6.HAFTA İDRAR PROTEİN														,644 0,0001
SERUM KREATİNİN	-,625 0,001				-,519 0,007									
SERUM ALBÜMİN		-,621 0,001		-,590 0,001			-,397 0,045				-,545 0,004			
TP		-,451 0,021	,416 0,035	-,533 0,005										
TK	-,678 0,000	,390 0,049							-,545 0,004					
TG	-,554 0,003													
GHS	,396 0,045					-,435 0,026				-,398 0,044				
İHS							,644 0,0001							

Adriamisin ile deneysel nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlarda (Grup 1,2 ve 3) 6.hafta idrar protein düzeyleri ile intersitisyel hasar skoru arasında pozitif bir korelasyon bulundu (Tablo 13, Şekil 18).



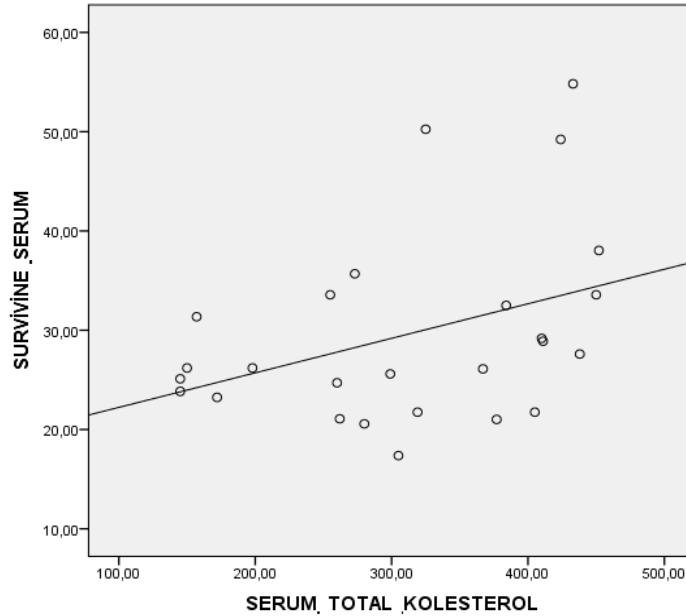
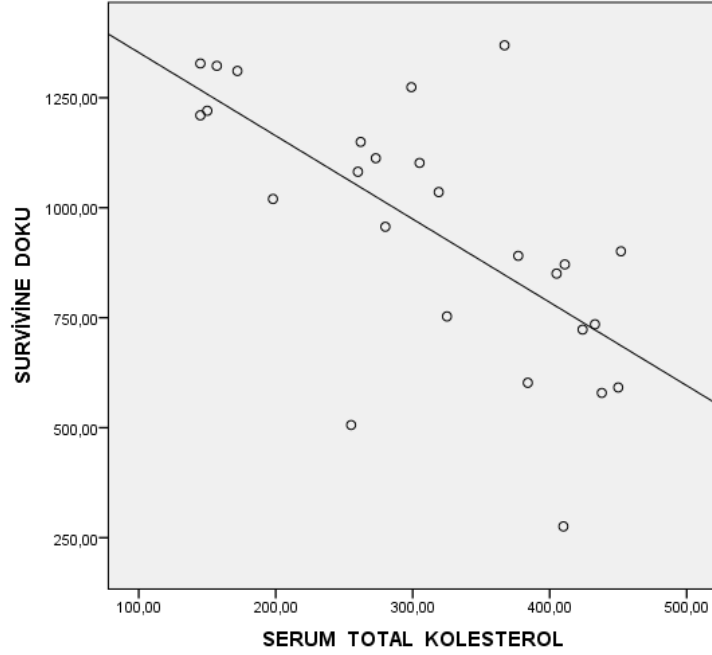
Şekil 18. Nefrotik sendromlu sıçanlarda, intersitisyum hasar skorunda artış olması ile 6.haftadaki idrar protein atımı da artmaktadır.

Deneysel nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlarda serum albümin düzeyleri ile serum survivin ve XIAP düzeyleri arasında negatif yönde bir ilişki saptandı (Tablo 13, Şekil 19). Bezer şekilde serum total protein düzeyleri ile serum survivin ve XIAP düzeyleri arasında negatif yönde korelasyonlar bulundu (Tablo 13). Ancak serum albümin düzeylerinden farklı olarak total protein düzeyleri ile renal doku XIAP düzeyleri arasında pozitif yönde; glomerular hasar skoru ile negatif yönde bir korelasyon vardı (Tablo 13, Şekil 20).



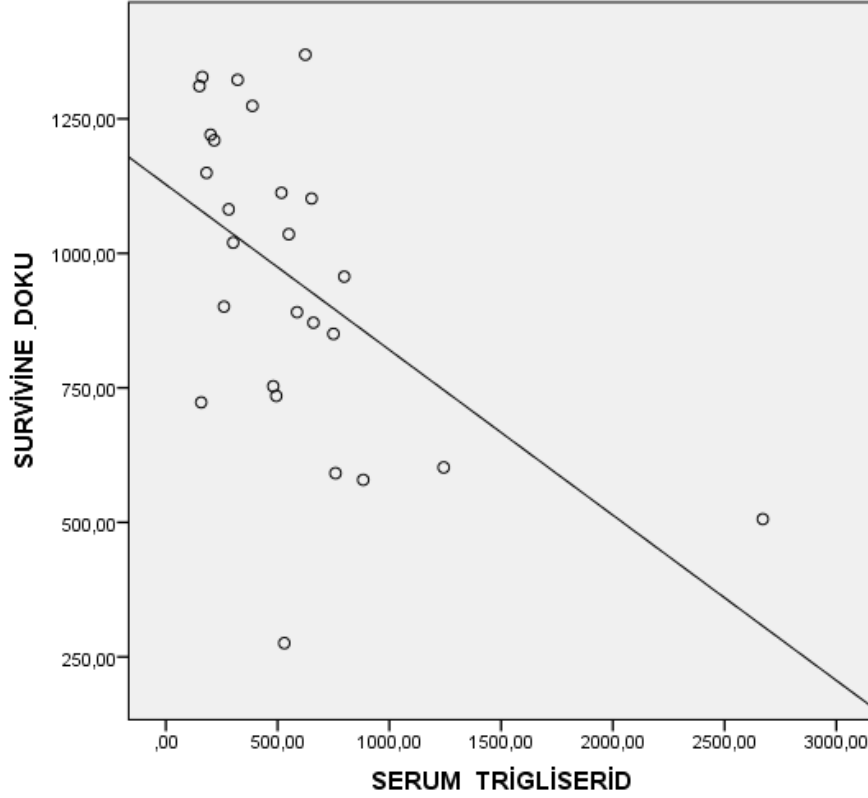
Şekil-19. Deneysel nefrotik sendrom oluşturulan ratlarda serum albümin düzeylerindeki azalma, serum survivin ve XIAP artışı ile birlikte.

Nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlarda serum total kolesterol düzeyleri ile renal doku survivini arasında negatif yönde bir korelasyon varken, serum survivini ile pozitif yönde bir korelasyon saptandı (Tablo 13, Şekil 21).



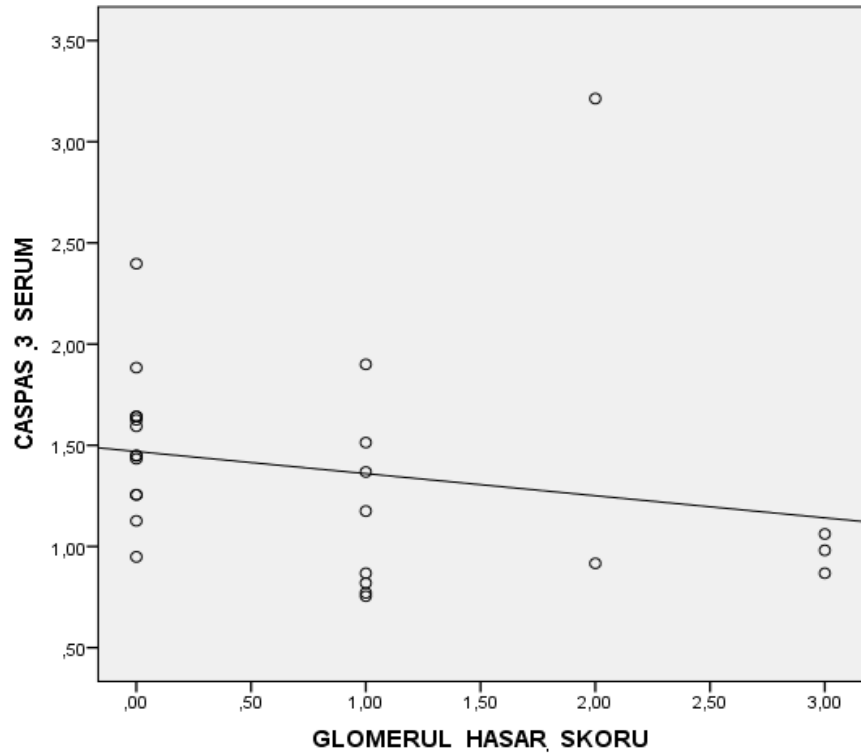
Şekil-21. Nefrotik sendromlu sıçanlarda serum total protein düzeyleri, renal doku survivin düzeyleri ile negatif yönde güçlü bir korelasyon gösterirken, serum survivin düzeyleri ile zayıf pozitif bir ilişki gösterdi.

Adriamisin ile deneysel nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlardaki serum trigliserid düzeyleri ile renal survivin doku düzeyleri arasında negatif bir korelasyon bulundu (Tablo 13, şekil 22)



şekil 22. Nefrotik sendromlu sıçanlarda serum trigliserid düzeylerinde görölen artışın renal doku survivini düzeylerindeki azalma ile birlikte olduğu saptandı.

Nefrotik sendromlu sıçanlarda intersitisyel ve tubuler hasar skorları ile anti apoptotik ve proapoptotik proteinler arasında herhangi bir korelasyon saptanmazken, glomeröler hasar skoru ile serum kaspaz-3 düzeyleri arasında negatif yönde ($r=-0,435$ ve $p=0,026$) zayıf bir korelasyon saptandı (şekil 23).



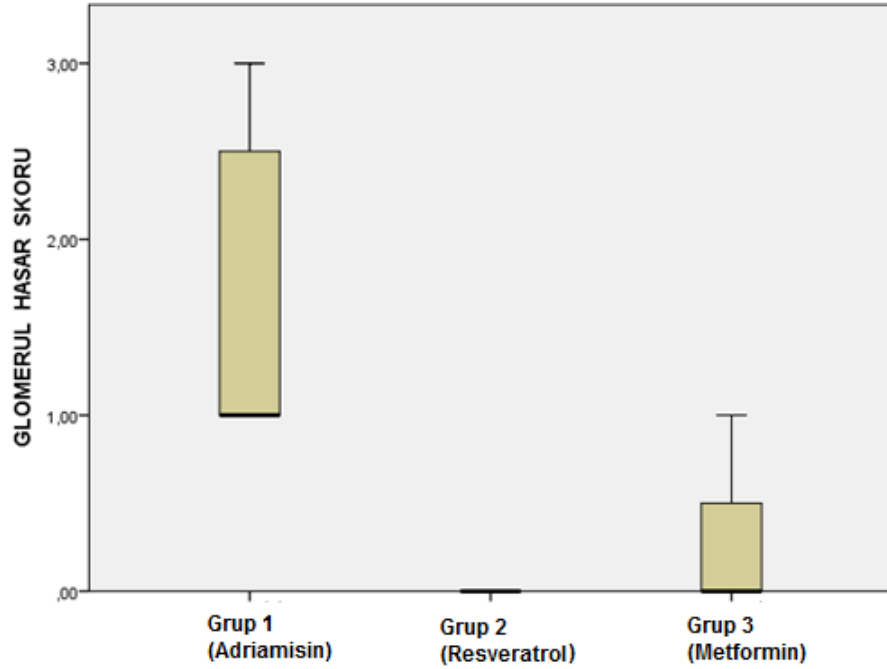
Şekil 23. Nefrotik sendromlu sıçanlarda glomerüler hasar skorlarının serum kaspaz-3 düzeylerindeki artış ile azaldığı bulundu.

Deneyssel nefrotik sendrom oluşturulan ve hiçbir tedavi uygulanmayan sıçanlara ait korelasyon analizi yapıldığında; renal survivin doku düzeylerinin serum kreatinini ile negatif ($r = -0,673$, $p = 0,023$); serum survivin ile serum albümin ve total protein düzeylerinin negatif (sırası ile $r = -0,715$, $p = 0,013$ / $r = -0,661$, $p = 0,027$) ve serum XIAP düzeyleri ile serum albümin düzeyleri arasında negatif ($r = -0,879$ ve $p = 0,0001$) korelasyonların olduğu saptandı. Bu gruptaki korelasyonlar, Grup1, 2 ve 3'e (nefrotik sendrom oluşturulan tüm sıçanlar) ait korelasyonlar ile benzerlik gösterdi. Farklı olarak, Grup 1'deki sıçanların glomerular, tübüler ve intersitisyel hasar skorları ile ölçümü yapılan anti-apoptotik proteinler survivin ve XIAP ve pro-apoptotik kaspaz-3 arasında ve ayrıca doku survivin ve serum trigliserid ve total kolesterol düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı.

PATOLOJİK DEĞERLENDİRMELER

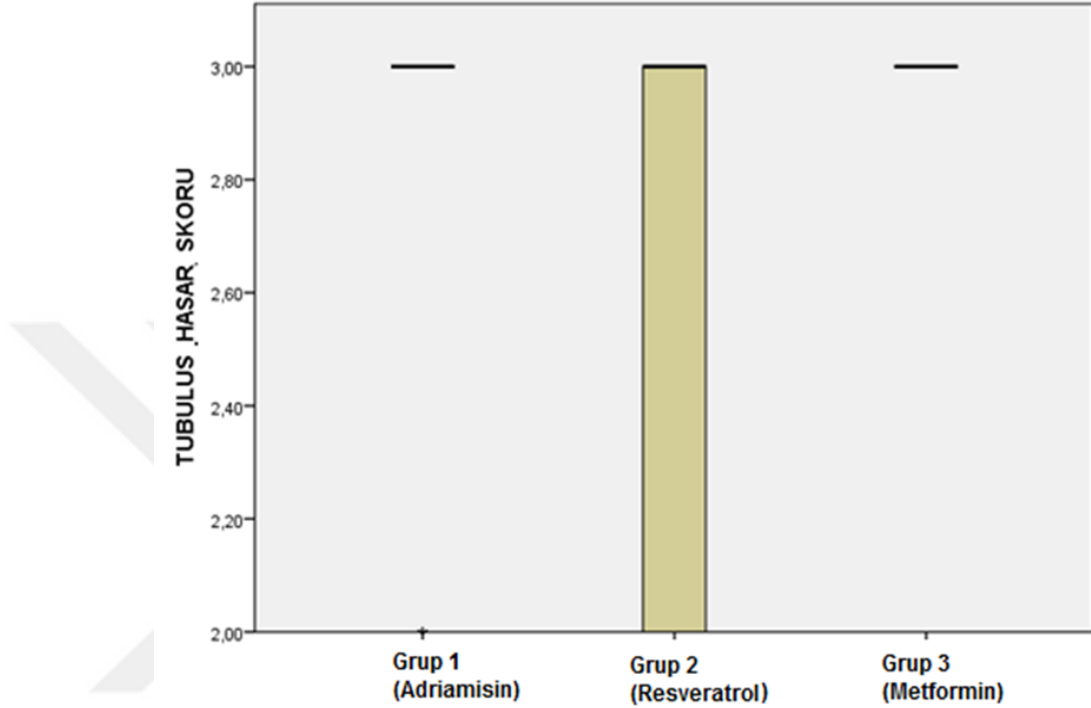
Adriamisin ile deneysel nefrotik sendrom oluşturulan tüm sıçanlardan elde edilen renal doku örnekleri glomerüller, tübüler ve intersitisyel hasar skorları ile puanlanarak patolojik olarak karşılaştırıldı.

Grup 2'deki (resveratrol) sıçanların glomerüler hasar skoru (median 0, minimum 0, maksimum 0) adriamisin grubundaki sıçanların glomerüler hasar skoruna (median 1,72; minimum 1, maksimum 3) göre anlamlı düşük bulundu ($p=0,0001$; Şekil 24). Benzer şekilde Grup 3'teki (metformin) sıçanların glomerüler hasar skoru (median 0,28 minimum 0, maksimum 1) adriamisin grubundaki sıçanların glomerüler hasar skoruna (median 1,72; minimum 1, maksimum 3) göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($P=0,002$; Şekil 24).



Şekil-24: Resveratrol ve metformin ile tedavi edilen sıçanların glomerül hasar skorları, tedavisiz gruba göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (sırası ile $p=0.0001$ ve $p=0.002$).

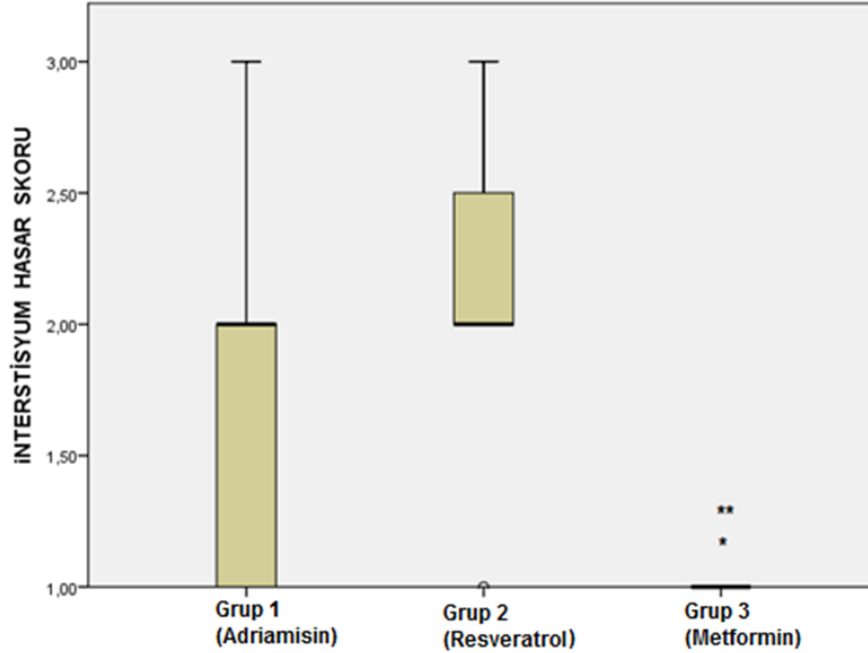
Deney gruplarındaki sıçanların tubulus hasar skorları arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Grup 1: 2,9, minimum 2, maksimum 3 / Grup 2: 2,6, minimum 2, maksimum 3 / Grup 3: 3, minimum 3, maksimum 3 ve $p=0,109$) (Şekil 25).



Şekil-25: Resveratrol ve metformin ile tedavi edilen sıçanların tubulus hasar skorlarında belirgin bir düzelme saptanmadı ($p=0,109$).

Grup 2’de resveratrol ile tedavi edilen sıçanların interstisyum hasar skoru (2,1; minimum 1, maksimum 3) ile tedavisiz gruptaki (Grup 1) sıçanların glomeruler hasar skoru (1,6; minimum 1, maksimum 3) arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,133$; Şekil 26). Buna karşın Metformin ile tedavi edilen Grup 3’teki sıçanların interstisyum hasar skoru (1; minimum 1, maksimum 1) Grup 1’deki tedavisiz bırakılan sıçanların glomerüler hasar skoruna (1,6; minimum 1, maksimum 3) göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p=0,04$; Şekil 26). Metformin ile tedavi edilen sıçanların (1; minimum 1, maksimum 1) interstisyum hasar skoru ise resveratrol ile tedavi

edilen sıçanlara göre (2,1; minimum 1, maksimum 3) daha fazla düzelme gösterdi ($p=0.001$; Şekil 26).



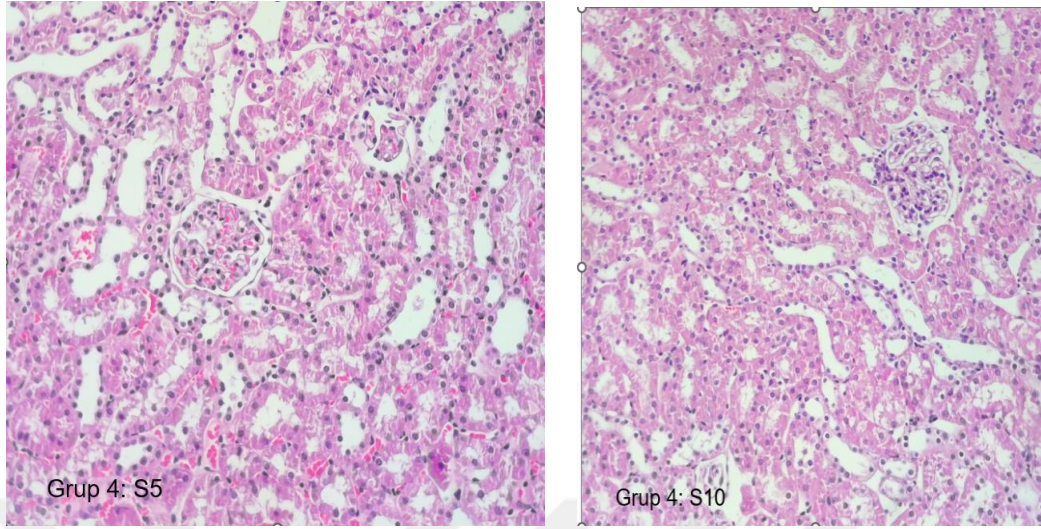
Şekil-26: Metformin tedavisi ile interstisyum hasar skorlarının, tedavisiz gruba göre (Grup 1) daha düşük olduğu saptandı. *Grup 3 vs Grup 1 ($p=0.04$) ve ** Grup 3 vs Grup 2 ($p=0.001$).

Kontrol grubunun böbrek kesitlerinde normal renal histomorfoloji mevcuttu (Şekil 27).

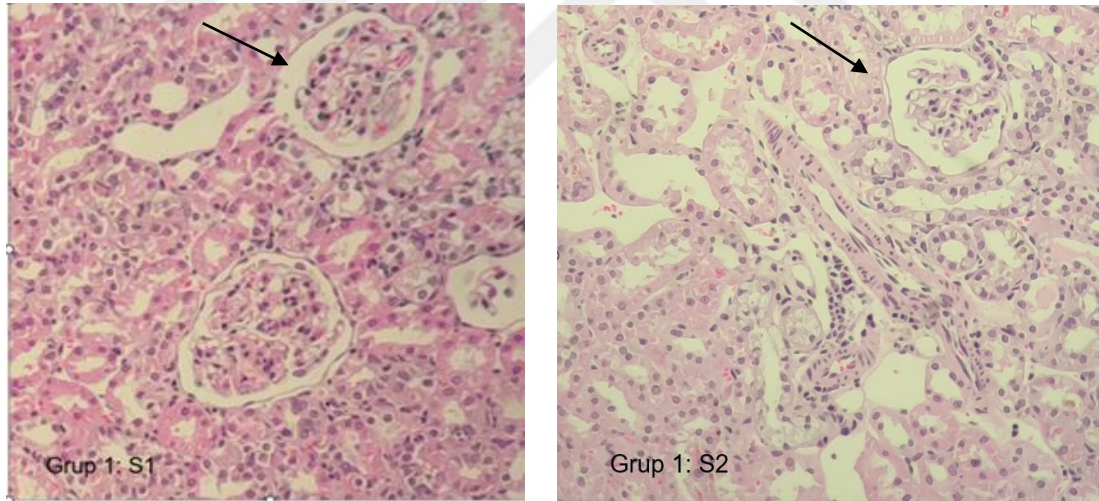
Grup 1'deki (adriamisin) sıçanlarda mezengial genişleme, iskemik kollaps, tubulaslarda hidropik dejenerasyon, bazal membran kalınlaşması ve interstisyumda inflamasyon gözlemlendi (Şekil 28).

Resveratrol ve metformin gruplarında tubulaslarda hidropik dejenerasyon, interstisyumda ödem ve inflamasyon görüldü (Şekil 29-30). Resveratrol ve metformin tedavileri alan gruplarda yalnızca adriamisin verilen grupta görülen glomerüler iskemik kollapsın düzelmiş olduğu saptandı.

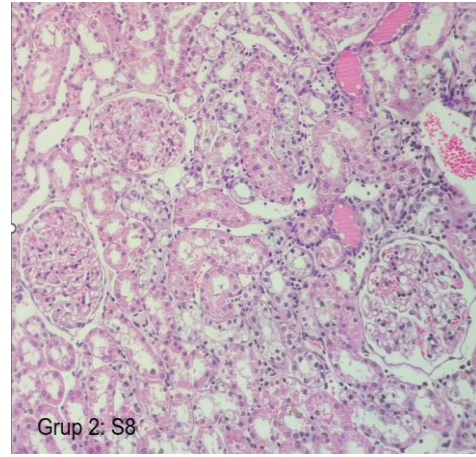
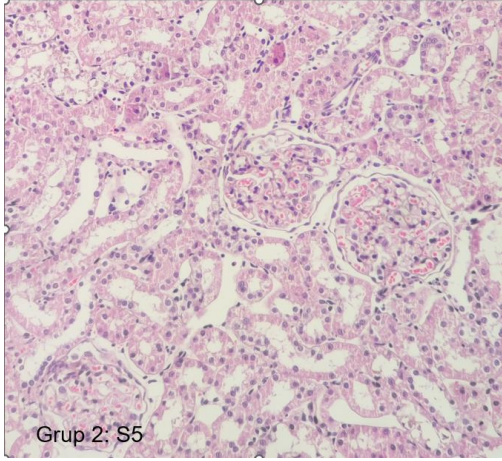
Deney ve kontrol grubundaki patolojik kesitlerde vasküler bir patolojiye rastlanmadı.



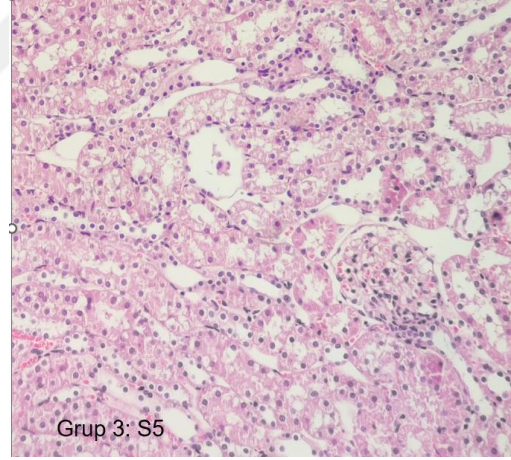
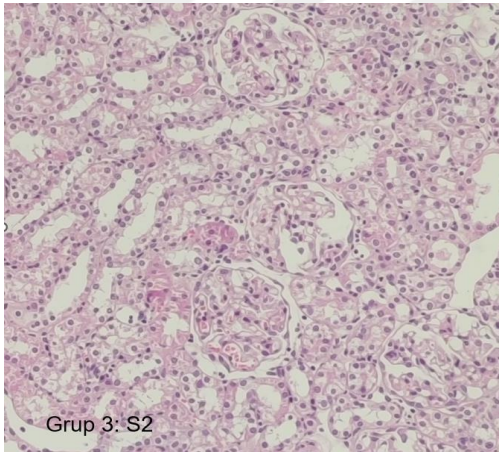
Şekil-27: Grup 4 (kontrol) patolojik değerlendirme: Kontrol grubuna ait preparatta normal renal histoloji gözlenmektedir.



Şekil-28: Grup 1 (adriamisin) patolojik değerlendirme: Adriamisin grubuna ait preparatta mezengial genişleme, iskemik kollaps, tubulustlarda hidropik dejenerasyon, bazal membran kalınlaşması ve interstisyumda inflamasyon gözlenmektedir. Ok ile işaretli alanlarda glomerüler iskemik kollaps gözlenmektedir.



Şekil-29: Grup 2 (resveratrol Grubu) patolojik değerlendirme: Resveratrol grubuna ait preparatta tubulularda hidropik dejenerasyon ve interstisyumda inflamasyon gözlenmektedir.



Şekil-30: Grup 3 (metformin Grubu) patolojik değerlendirme: Metformin grubuna ait preparatta tubulularda hidropik dejenerasyon, interstisyumda ödem ve inflamasyon gözlenmektedir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Nefrotik sendrom, proteinlerin kandan idrara hasarlı glomerüller yoluyla sızması ile karakterize çocukluk çağında en sık görülen glomerüler hastalıdır. Nefrotik sendromlu hastaların büyük bir kısmını sistemik bir hastalığın ve eşlik eden inflamasyonun olmadığı idyopatik nefrotik sendrom oluşturur. İdyopatik nefrotik sendrom 1-10 yaş arasındaki vakaların yüzde 90'ından fazlasını ve 10 yaşından sonra yüzde 50'sini temsil eden çocukluk çağı nefrotik sendromunun en yaygın şeklidir. İdyopatik nefrotik sendrom, elektron minimal değişiklik hastalığı, fokal segmental glomerüloskleroz ve ışık mikroskopunda mezangial proliferasyon gösteren üç farklı formda izlenebilir (28). Fokal segmental glomerüloskleroz steroid dirençli nefrotik sendrom vakalarının temel patolojisini oluşturmaktadır ve etyo-patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (130). Nefrotik sendrom gelişmesinde podosit ve glomerüler filtrasyon bariyer kusurları, T ve B hücrelerinde immün disregülasyonlar, dolaşımda permeabilite faktörlerinin ve glomerüler filtrasyon bariyerini oluşturan proteinlerdeki mutasyonlar varlığı suçlanmaktadır. Öte yandan apoptozis birçok çalışmada önemli bir podosit hasar mekanizması olarak araştırma konusu yapılmıştır (344-347). Apoptoz çok sayıda böbrek hücresi kaybının ve/veya böbrek iltihabının, skarlaşmanın, böbrek fonksiyonunun kaybının bir kaynağı olması nedeni olabilir. Ayrıca tübüler hücrelerde albuminin geri emilmesi nedeni ile ortaya çıkan apoptoz ve buna bağlı tübüler hasar da gösterilmiştir (348). Çalışmamızda adriamisin ile deneysel nefrotik sendrom oluşturarak rat böbrek doku ve serumunda önemli bir apoptotik gösterge olarak kabul edilen kaspaz-3 düzeylerini inceledik. Deneysel olarak nefrotik sendrom oluşturulan ratlardaki (Grup 1), doku kaspaz-3 düzeyleri kontrol grubu ile benzerken ($p>0.05$), serum kaspaz-3 düzeyleri ise kontrol grubundan daha düşük bulundu ($p=0.01$, Tablo 11). Anti apoptotik bir protein olan Yes-associated-protein'in fokal segmental glomerülosklerozdaki rolünü inceleyen ve adriamisin ile ratlarda nefrotik sendrom oluşturulan bir çalışmada immün boyama ölçümlerinde doku kaspaz 3'ün protein ekspresyonunun yukarı regüle edildiğini göstermiştir (349).

Geleneksel Çin tıbbında kullanılan Citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal), yeşil çayda bulunan katekinlerin bioaktif formu olan Epigallocatechin-3-gallate ve bir kumarin bileşiği Osthole'ün, anti apoptotik etkilerinin incelendiği adriamisin ile nefrotik sendrom oluşturulan ratlarda yapılan üç çalışmada da doku kaspaz 3 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (350-352). Steroid duyarlı ve dirençli pediatrik nefrotik sendrom olgularının karşılaştırıldığı bir çalışmada doku kaspaz-3 düzeylerinin steroid dirençli olgularda, steroid duyarlılara göre daha yüksek olduğu ve steroid rezistansını belirlemeye aday bir biobelirteç olduğu ileri sürülmüştür (353). Literatürdeki bu çalışmaların aksine böbrek doku kaspaz-3 düzeylerinde kontrollere göre bir değişme bulamamış olmamızın nedenleri şunlar olabilir: (i) apoptozis adriamisin ile nefrotoksisite ve dolayısı ile proteinüri oluşmasında kritik bir öneme sahip olmayabilir. Podosit apoptozis ile ilgili bilgiler, deneysel çalışmalardaki kaspaz-3 ölçümlerinden ve TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) ile elde edilen verilere dayandırılmaktadır. Apoptozun en güvenilir kanıtı elektron mikroskobu ile apoptotik cisimlerin saptanmasıdır (deneyimizde bu tür bir çalışma yapılmamıştır) (354). Ancak yayınlanmış hiçbir çalışma in vivo olarak podositlerde apoptotik cisimlerin varlığını bildirmemiştir (355). Glomerül bazal membranından ayrılan podositlerin genellikle yaşadığı ve kültürlenebildiği gösterilmiştir (356). Bu bulgular apoptozun podosit dekolmanının önemli bir nedeni olmadığını göstermektedir. Anoikis, otofaji, nekroptozis veya mitotik katasrofi gibi diğer hücre ölümü türleri, in vivo podosit ölümünün hala olası nedenleri olabilirler (357). Benzer şekilde adriamisin, apoptozis dışındaki diğer hücre ölüm modu olan piroptozu özellikle kaspaz-1 aracılığı ile uyabilir. (ii) Adriamisin ile oluşturulan nefrotik sendromda (ve olasılıkla bunun bir yansıması olarak klinik nefrotik sendromlu hastalarda) renal dokuda apoptozis olmayabilir. Çalışmamızda nefrotik sendromlu sıçanlarda renal dokuda kaspaz-3, serum survivin ve XIAP düzeylerinin kontrol grubuna göre değişmemiş olması bu olasılığı desteklemektedir. (iii) Adriamisin ile ortaya çıkan nefrotoksisite patogenezinin oksidatif stres ve demir antrasiklin serbest radikallerinin oluşumunun sorumlu olabileceği ileri

sürülmüştür (358-359). Gerçekten de renal GSH düzeylerinde azalma ve ile birlikte olan renal MDA düzeylerinde artışın tübüler nekroz gibi histopatolojik değişimlerle paralel seyrettiği gösterilmiştir (360). Öte yandan adriamisin renal COX-2 düzeylerinde artışa neden olur ve bu artış glomerüler mezanjiyal hücreleri apoptoza karşı koruyabilir (360). (İV) Kaspaz-3, apoptozun oldukça spesifik bir belirteci olmakla birlikte, apoptozun kaspaz-3'ün katılımı olmaksızın kaspaz-6 ve 7 yolu ile de gerçekleşebilir (361). Deney gruplarımızdaki sıçanlarda doku/serum kaspaz-6 ve 7 ölçümü yapılmamış olması, apoptozisin gösterilememiş olmasının bir nedeni olabilir (V) Öte yandan Grup 1'deki sıçanlarda kaspaz-3 düzeylerinin renal dokuda değişmemiş ve serumda azalmış olması, düşük ve/veya hafif aktive kaspaz-3'ün koruyucu etkilerinden kaynaklanabilir (362). Kaspaz-3'ün katalitik potansiyelinin fazlaca aktivasyonu, apoptoz ile hücre ölümünün ortak bir başlatıcısıdır. Bununla birlikte, hafif stresli hücrelerde düşük kaspaz aktivitesi seviyeleri, hücre ölümüne karşı koruma sağlayabilir. Hafif stresli hücrelerde, düşük kaspaz-3 aktivitesi seviyeleri, anti-apoptotik Akt kinazın aktivasyonu yoluyla, daha sonra da mTOR veya NF-KB uyarısı ile hücrelerin hayatta kalmasını teşvik edebilir. Aktive edilmiş Akt, Bad gibi proapoptotik molekülleri inaktive ederek kaspaz aktivitesinin daha fazla amplifikasyonunu da önler (362). (VI) Serum kaspaz-3 düzeylerinin tedavi edilmemiş nefrotik sıçanlarda kontrol grubuna göre düşük olması, hematopoetik hücrelerde adriamisin ile ortaya çıkan apoptozise yanıt olarak anti-apoptotik proteinler olan survivin ve XIAP'ın kaspaz-3 aktivitesini azaltması ile açıklanabilir (çalışmamızda nefrotik sıçanlarda serum survivin ve XIAP düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu, Tablo 11, Şekil 13-14). Benzer bir gözlem Lee ve arkadaşları (363) tarafından kültüre H9c2 kardiyak miyozit hücrelerinde rekombinant survivin uygulanması sonrasında kaspaz-3 aktivitesinin düşmesi ile gösterilmiştir.

Nefrotik sendromlu hastalarda kullanılan steroid ve diğer immun supresif ilaçlar ciddi yan etkilere sahiptirler. Bununla birlikte, bu hasta kohortunda apoptozu ve apoptoza bağlı bozuklukları düzenleyen toksik olmayan spesifik ilaçlar bulunmamaktadır. Bu amaçla resveratrol ve

metformin ile tedavi ettiğimiz (Grup 2 ve 3) sıçanlarda renal doku kaspaz-3 düzeylerinin, tedavi edilmeyen sıçanlar (Grup 1) ve kontrol grubu ile benzer olduğunu saptadık (Tablo 10, Şekil 12). Bu bulgumuz resveratrol ve metforminin nefrotik sendromda renal doku kaspaz-3'ünün düzeylerini düşürmek yolu ile apoptozisi azaltmadığını, renal dokuda apoptozisi engellemek sureti ile renoprotektif bir etki gösteremeyebileceğine işaret etmektedir. Resveratrolün apoptozis dışındaki etkiler yolu ile renoprotektif etkileri olduğunu gösteren sınırlı sayıda çalışmalar bu verilerimizi desteklemektedir. Sisplatin ve kadmiyum ile oluşturulan nefrotik olmayan deney modellerinde resveratrolün renal tübüler hücrelerde kaspaz-3'ün protein ekspresyonu azalttığı gösterilmiş ise de, sıçan ve ölümsüz podosit hücre deneylerinde, resveratrolün podositlerdeki koruyucu etkisinin oksidatif stresi bloke etmek ve adhezyon moleküllerini (P-caderin, zonula okludens-1 vb) artırıp, α -SMA protein seviyelerini azaltmak yolu ile oluştuğu gösterilmiştir (324,364). Liu ve arkadaşları adriamisin ile oluşturdukları nefrotik sendrom modelinde resveratrolün renoprotektif etkisinin C3aR/C5aR- Sphingozin Kinaze 1 yolağı ile oluşan anti-inflamasyon ve anti-fibrozis sonucunda meydana geldiğini göstermişlerdir (365).

Bilgilerimize göre metforminin adriamisinle oluşturulan nefrotik sendrom modellerindeki etkisi ile ilgili yayınlanmış bir makale bulunmamaktadır. Metforminin anti-apoptotik renoprotektif etkileri genellikle diyabet ile ilişkili olmak üzere, anormal otofajiyi, endoplasmik retikulum stres ve lipotoksisite düzetmesine bağlanmıştır (366). Ratlarda oluşturulan bir diyabetik nefropati modelinde hipergliseminin kaspaz-3'ü artırdığı bulunmuştur (367). Allouch ve Munusamy tarafından albümin ile oluşturulmuş renal tübüler hasar modelinde, metforminin tübüler hücrelerde kaspaz-3'ü azalttığı saptanmıştır (368). Çalışmamız da ise renal doku kaspaz-3 düzeyleri metformin tedavisi ile herhangi bir değişim göstermemiştir. Bu durumun nedenleri adriamisin ile oluşturulan nefrotik sendrom patogenezinde yukarıda anlatıldığı gibi apoptozisin ana faktör olmaması; metformininin anti-apoptotik etkilerden çok, santral podosit proteinlerinin ekspresyonunu iyileştirmesi, aktin hücre iskeletinin dinamiklerini düzenlemesi, otofajiyi aktive etmesi, TGF-

β 'nin renal ekspresyonunun azaltması ile fibrozisin ve makrofaj migrasyon inhibitör faktör aracılı podosit inflamasyonunu azaltması olabilir (369).

Öte yandan serum kaspaz-3 düzeyleri, resveratrol ve metformin ile tedavi edilen sıçanlarda, tedavisiz bırakılan nefrotik sıçanlara göre artmış ve kontrol grubu ile benzer hale gelmiştir (Tablo 11, Şekil 15). Yaptığımız literatür incelemesinde resveratrolün deneysel veya klinik nefrotik sendromda serum kaspaz-3 üzerine olan etkilerini gösteren bir çalışma bulamadık. Literatür bilgilerimize göre, çalışmamız resveratrolün deneysel nefrotik sendromda serumda kaspaz-3 düzeylerini artırdığına ilişkin ilk verilerdir. Verilerimiz resveratrolün nefrotik serumda kaspaz-3'ü azaltarak apoptozisi engellemediği aksine uyardığını göstermektedir. Benzer gözlemlerde resveratrolün aktive T hücrelerinde; normal ve lökemik hematopoetik hücrelerde apoptozisi uyardığı saptanmıştır (370-371). Serumda görülen bu apoptotik aktivite artışı yararlı sonuçlar doğurabilir: Çalışmamızda, serum kaspaz-3 düzeylerinin resveratrol / metformin tedavileri ile glomerüler hasarın ve serum kreatinin düzeylerinin azaldığını saptadık (Tablo-13, Şekil 23). Resveratrol ve metformin tedavileri serumdaki hematopoetik hücrelerde kaspaz-3 yolu ile apoptozisi uyararak, muhtemelen periferik T veya diğer hücre kaynaklı podosit ve/veya tubuler hücre hasarını önlemeye katkıda bulunuyor olabilir. Bu bulgular nefrotik sendromda resveratrol ve metformin kullanımının olumlu klinik sonuçları olabileceğini göstermekle birlikte, doku ve serum kaspaz-3 düzeyleri ile serum albümin, trigliserid ve total kolesterol arasındaki korelasyonların olmaması, daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğuna vurgu yapmaktadır.

Survivin apoptozis inhibitör ailesinin en küçük üyesidir olup normalde sadece prolifer / rejeneratif hücrelerde ekprese edilir (kemik iliği, eritrosit ve lökosit diferansiyasyonu vb). Hücre çekirdeğindeki survivin Aurora-B, INCENP ve Borealin ile bağlanır ve mitozu düzenler. Mitokondriyal survivinin Cyt-C veya SMAC/DIABLO ile bağlanması ve sitoplazmadaki survivinin HSP-90 veya XIAP ile bağlanması, pro-kaspaz-9'a bağlanma yoluyla intrinsek apoptozu engeller. Mitokondriyal survivin AIF'e bağlınırsa DNA hasarını inhibe edebilir. Sitoplazma SVN, kaspaz-3'e (ekstresek apoptozis)

bağlanarak apoptozu inhibe eder. Sitoplazmik survivin eksozomal geçiş ile hücre dışı matrise salınabilir (372). Bilgilerimize göre adriamisin ile oluşturduğumuz deneysel nefrotik sendrom modelimizle, ilk kez nefrotik renal doku ve plazma sürvinin düzeylerini ve bunların serum kreatinin, albümin, trigliserid, total protein ve kolesterol ile korelasyonlarını belirledik. Çalışmamızda Grup 1'deki (adriamisin) nefrotik sıçanların doku sürvinin düzeylerinin kontrol grubu ile benzer olduğunu, renal doku sürvinin düzeylerinin resveratrol ve metformin tedavileri ile azalarak kontrol değerlerinin altına indiğini bulduk (Tablo-10, Şekil-10). Resveratrol'den farklı olarak metformin tedavisi ile doku sürvinin düzeyleri tedavisiz gruba göre de azaldı (Tablo-10, Şekil-10). Doku sürvinin düzeylerinin azalması kanser hücrelerinin büyümesini önlemek bakımından yararlı olabilirken, kanser dışı dokularda apoptozisin artışına yol açabilir. Resveratrolün renal hücre karsinomlarında doza bağlı olarak survivin ekspresyonunu suprese ettiği gösterilmiştir (373). Buna karşın sıçanlarda Thy-1N ile oluşturulan membranoproliferatif glomerulonefrit modelinde miR-3546-SOX4-survivin aksının inhibe edilmesinin glomerular mezangiyal hücrelerde apoptozise sebep olmuştur (374). Benzer şekilde metforminin glomerular hastalıklarda survivin üzerine olan etkileri de bilinmemektedir. Akciğer kanseri ile ilgili yapılan deneysel bir çalışmada, metformin esas olarak A549 ve H460 hücre dizilerinde apoptotik hücre ölümünü indüklemiş, survivin ekspresyonunu önemli ölçüde suprese etmiş, bu proteinin stabilitesini azaltmış ve ardından proteazomal bozulmasına yol açmıştır (375). Çalışmamızda da nefrotik sendromlu sıçan renal dokusunda metformin ile survivin düzeylerinde azalma meydana gelmiştir. Nefrotik böbrek dokularındaki bu azalma muhtemelen metforminin adenosin 5'-monofosfatla aktive olan protein kinaz aktivasyonu ve protein kinaz A ve glikojen sentaz kinaz 3β (GSK-3β) aktivasyonunu suprese etmesi ile ilgili olabilir (375-376). Ancak nefrotik sendromdaki survivin azalması ile ilgili olası başka yolların araştırmalarına ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, çalışmamızda resveratrol ve metformin tedavileri ile proapoptotik doku kaspaz-3 düzeylerinde artış ve anti apoptotik XIAP düzeylerinde azalma olmaması, bu tedavilerin deneysel modelimizde doku

survivinini azaltmak sureti ile apoptozise yol açmadığını göstermektedir. Üstelik, doku survivin düzeyinde azalma aynı zamanda doku kaspaz-3 düzeyini de azaltmaktaydı (renal doku survivin düzeyi, renal doku kaspaz-3 ile pozitif korelasyon gösteriyordu, $r=0,589$; $p=0.002$).

Deneyimizde resveratrol ve metformin tedavileri ile serum survivin düzeyleri azalmış ancak çalışma grupları arasında serum trigliserid ve total kolesterol düzeyleri bakımından herhangi bir fark ortaya çıkmamış ve lipid değerleri normale dönmemiştir. Renal doku survivin düzeyinde sağlanabilecek artışların nefrotik sendromdaki dislipidemiye düzeltebileceğine işaret eden nefrotik sıçanlardaki (Grup 1,2 ve 3) doku survivin ile serum trigliserid ve total kolesterol arasındaki negatif korelasyonlar hiçbir tedavinin uygulanmadığı (Grup 1) sıçanlarda bu korelasyonlar yoktu. Genel olarak dislipidemi, diyabetes mellitus, metabolik sendromda yapılan çalışmalar ile metforminin trigliserid sentezini ve şilomikronların temizlenmesini artırarak serum kolesterolünü düşürdüğü (377); resveratrolün ise doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ve serum kolesterol ve trigliserid düzeylerini azaltıcı etkileri olabileceği bildirilmiştir (378-379). Akbari ve arkadaşları ise resveratrolün metabolik sendromlu hastalarda serum trigliserid düzeylerini düşürmediğini bulmuştur (380). Bilgilerimize göre literatürde resveratrolün nefrotik sendromdaki hiperlipidemiye olan etkileri ile ilgili bir çalışma varken, metforminin etkileri ile ilgili yayınlanmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Anti-sıçan böbrek glomerüler bazal membran tavşan anti-serumu ile nefrit oluşturulan bir deney modelinde resveratrolün hipotrigliseridemik etkisinin, hipokolesterolemik olandan daha belirgin olduğu bulunmuştur (381). Önceki çalışmalar ve çalışmamız arasındaki çelişkiler, kullanılan hiperlipidemik modellerdeki ve dolayısıyla hiperlipidemi indüksiyonu yapan mekanizmalardaki farklılıklarla açıklanabilir. Örneğin son zamanlarda diğer bozuklukların hiperkolesterolemi patogenezinin farklı olarak kortikal kollektör duktuslarda artmış proprotein konvertaz subtilisin keksin tip-9 ekspresyonunun, primer nefrotik sendromda serum kolesterol artışının başlamasında rol oynayabileceğini gösterilmiştir (382). Sonuç olarak, deney verilerimiz resveratrol ve metformin tedavilerinin, nefrotik

sendromda hiperlipidemiye düzeltici etkilere sahip olamayabileceklerini göstermektedir.

Resveratrol ve metformin tedavilerinin renal doku survivin düzeyini azaltması glomerular hasarın nedenlerinden veya artmasına neden olan faktörlerden biri olabilir. Survivin düzeyindeki artışların Adrb3/cAMP sinyalleme yolağının inhibe ederek adiposit lipolizini inhibe ettiği gösterilmiştir (383). Resveratrol ve metformin böbrek dokusunda survivin düzeylerini azaltır, bu etki lipolizin ve dolayısı ile serbest yağ asitlerinin artışına, serbest yağ asitlerinin böbrek korteksinde birikmesi ise nefrotik böbreklerde glomerüler hasarın gelişmesine katkıda bulunmuş olabilir. Kim ve arkadaşları farelerdeki deneysel Alport modellerinde bu etkiyi gözlemlemişlerdir (384). Bütün bu etkilerin yanında, resveratrol ve metformin tedavileri ile renal doku survivin düzeylerinde saptadığımız azalma böbrek hücrelerinde apoptozisin artması gibi olumsuz bir tabloya neden olabilirken, survivin düzeyindeki bu azalma aynı zamanda anti-mitogenik bir etki yaratarak nefrotik böbreklerde sıkça görülen mezangiyal hücre hiperselülaritesinin azalmasına katkıda bulunarak glomerulus bütünlüğünün devamında rol oynuyor olabilir. Buna kanıt olarak çalışmamızda resveratrol ve metformin tedavileri ile renal dokuda bulduğumuz glomerular ve interstisyel hasarın tedavisiz gruba göre anlamlı düzeyde azalmasını gösterebiliriz (Şekil 24 ve 26).

Deneyimizde nefrotik sendromlu sıçanlarda (Grup 1,2 ve 3) serum sürvinin düzeylerini benzer ancak kontrol grubundan yüksek bulduk. (Tablo-11, Şekil 13). Çalışma (Grup 1 ve 2) gruplarına verilen resveratrol ve metformin tedavileri renal dokudaki survivin düzeylerinde azalmaya yol açmasına benzer bir şekilde durumda herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır (Tablo 10, Şekil 10). Serumda görülen survivin artışları adriamisin kan hücrelerinde oluşturduğu apoptozise sekonder / kompensatuar olarak ortaya çıkmış gibi görünmektedir. Gerçekten de adriamisin uygulamasını takiben 24 saat içinde normal periferik lökositlerin tüm alt gruplarında apoptozis geliştiği bulunmuştur (385). Ancak serum survivin artışı ile albümin ve total protein düzeyleri arasında negatif bir korelasyonlar saptadık (sırası ile $r=-$

0,621 ve $p=0,001$ / $r=-0,451$ ve $p=0,021$; Tablo 13). Bu olumsuz etki adriamisin ile ortaya çıkan kan hücrelerindeki (periferik lökositler) apoptozisin ağırlığını yansıtır olabilir. Ölçülen parametrelerin (survivin, kaspaz-3 ve XIAP) tedavisiz nefrotik sıçan böbrek dokusunda kontrol grubu ile benzer olması, proteinüri dolayısı ile ortaya çıkan albümin düşüklüğünün esas kaynağının apoptotik lökositler (ve alt grupları) olabileceğini düşündürmektedir. Bu lökositlerden (özellikle lenfositlerden) apoptozis nedeni ile salgılanabilecek vasküler permeabilite artırıcı faktörler sıçanlarda nefrotik sendroma (proteinüri ve hipo-albüminemiye) neden olmuş olabilir. Gerçekten de klinik ve deneysel kanıtlar, dolaşımdaki geçirgenlik faktörlerinin patogenezinde rol oynadığını göstermektedir (386).

XIAP, apoptoz inhibitörü protein ailesine ait her yerde eksprese edilen bir proteindir. Taşıdığı çinko bağlayıcı bakulovirüs alanları kaspaz-3, -7 ve -9'u doğrudan inhibe ederek XIAP'ye anti-apoptotik aktivitesini kazandırır. XIAP, NF- κ B ve MAPK yollarını aktive edebilir. E3 ubiquitin ligaz fonksiyonu hedef proteinlerin proteozomal yıkımını veya protein fonksiyonunu değiştirmesini sağlar (247). Bu özellikleri ile XIAP eksikliğinin sonucu proinflatuar sitokinlerin aşırı üretimi (kronik bir hiperinflamasyon) ve hücre ölümüdür. Yaptığımız literatür araştırmasına göre, adriamisin ile oluşturduğumuz deneysel nefrotik sendrom modelimizle, ilk kez nefrotik renal doku ve plazma XIAP düzeylerini ve bunların serum survivin, albümin ve total protein ile korelasyonlarını belirledik. Deneyimiz sonucunda çalışma grupları arasında renal doku XIAP düzeylerinin benzer olduğunu (Tablo 10), serum XIAP düzeylerinin nefrotik sıçanlarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu saptadık ve (Tablo 11). Buna göre resveratrol ve metformin tedavileri nefrotik sıçanlarda renal doku ve serum düzeylerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmamaktadır. Buna karşılık glomerulopati dışı, kanser araştırmalarında metforminin XIAP düzeylerini baskıladığı gösterilmiştir. İnsan üçlü (östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve HER2)-negatif meme kanseri hücrelerinin metformin ile tedavisi, XIAP mRNA azalması olmaksızın, mTORC1'in inhibisyonu yoluyla XIAP protein seviyelerinde azalma post-translasyon süreci ve mekanizması ile sonuçlanmıştır (387).

Prostat kanser hücreleri ve metformin ile yapılan bir başka çalışmada da metforminin XIAP düzeylerini suprese ettiği rapor edilmiştir (388). Metformine benzer şekilde resveratrol de kanser hücre çalışmalarında (insan çoklu miyelom hücre hatları, prostat kanseri LNCaP hücreleri vb.) XIAP düzeylerini azaltmaktadır (389-390). Nefrotik ratlarda XIAP renal doku düzeylerinin değişmemesi, doku kaspaz-3 ve survivin düzeylerinin de çalışma gruplarında benzer olması ile birlikte ele alındığında, adriamisin tetiklediği nefrotik sendrom böbreklerinde apoptozis olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Oysa serum XIAP düzeyleri çalışma gruplarında (Grup 1, 2 ve 3) arasında istatistiksel bir fark yokken, bu grupların serum XIAP düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksekti. Çalışma gruplarındaki nefrotik sıçanlardaki serum XIAP yüksekliği, kanda özellikle periferik lökositlerde adriamisin ile gelişen apoptozise sekonder olarak ortaya çıkmış gibi gözükmemektedir (385). Adriamisin ile hasarlı apoptotik lökositler ve bunların alt gruplarından salgılanabilecek olası vasküler permeabilite artırıcı faktörler nefrotik sendrom gelişmesine katkıda bulunmuş olabilirler. Nitekim serum XIAP ile albümin ve total protein arasındaki negatif korelasyonların varlığı bu görüşü desteklemektedir. Yani adriamisin kanda (olasılıkla periferik lökositlerde) yol açtığı apoptozisi baskılamak üzere sekonder olarak XIAP düzeyleri arttıkça (aslında apoptozis derinleştikçe) serum albümin ve total protein düzeyleri düşmektedir. Lineer regresyon analizi de serum albümine, negatif yönde etkili olmak üzere, en önemli faktörün artan serum XIAP düzeyleri olduğunu göstermektedir.

Adriamisin ile oluşturulan nefrotik sendrom modelinde 6. hafta sonunda deney gruplarındaki sıçanların böbrek dokuları glomerüler, interstisyel, tübüler ve damarsal patolojiler açısından karşılaştırıldı. Nefrotik sıçanların böbreklerinde damarsal patolojilerin olmadığı saptandı. Gözlemlerimiz, resveratrol ve metformin tedavileri ile böbrek dokularında izlenen iskemik kollapsın ve glomerüler hasarın iyileşmesinin, metforminin ek olarak interstisyel hasarın da düzeltilmesinin bu ilaçların sahip oldukları anti-apoptotik etkilerinden bağımsız olarak geliştiğini göstermektedir. Çünkü tedavi edilmeyen Grup 1'deki nefrotik sıçanlarda renal doku survivin, XIAP ve

kaspaz-3 düzeyleri kontrol grubu ile benzerdi ve renal dokuda apoptozis varlığını desteklemiyordu. Patolojik preparatlardaki değişmelerle de kanıtladığımız iyileşmelerler metforminin [otofajiyi indüklemesi (391), oksidatif stresi azaltması (12), endoplazmik retikulum stresini azaltması (339), anti-inflamatuar etkiler göstermesi (392), lipotoksiteyi önlemesi (393) ve antifibrotik etkinliklerinin (TGF β 1'in reseptörüne bağlanmasını bloke etmesi, Epiyelyal-mezenkimal geçişin önlenmesi, yağ asidi oksidasyonunu uyarması, tübüler HIF1 α stabilizasyonu (366); ve resveratrolün [TGF- β 1 ile indüklenen mezangiyal hücre proliferasyonunu inhibe etmesi, renal epitelyal ve mezangiyal hücrelerde oksidatif stres inflamasyon, mitokondriyal süperoksit ve ROS üretimini, mitokondriyal disfonksiyon ve metabolik stresi azaltması; podositlerde zar bütünlüğü ve metabolik akışı koruması ve oksidatif stresi iyileştirmesi (306) nefrotik böbrekler üzerine olan yararlı etkilerinin bir bütünü ile açıklanabilir.

Resveratrol ve metformin tedavilerindeki patolojik düzelmenin bir yansıması olarak nefrotik sıçanlarda proteinüri miktarında da azalma saptadık. Altıncı haftada nefrotik sıçanlarda (Grup 2 ve 3'te) idrar protein düzeyleri dördüncü haftaya göre hem metformin hemde resveratrol ile istatistiksel anlamlı olarak azaldı (Tablo 9, Şekil 9). 6. Haftada metformin ve resveratrol kıyaslandığında, metformin tedavisi ile idrar protein atımı resveratrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha azdı. Altıncı haftadaki proteinüri düzeyine en fazla etki eden faktör böbrek dokusundaki intersitisyel hasardı (Şekil 16). Anti-sıçan böbrek glomerüler bazal membran tavşan anti-serumu ile nefrit oluşturulan bir deney modelinde resveratrolün proteinüriyi baskılayabilen güçlü bir anti-glomerülonefritik faktör olduğu ileri sürülmüştür (381). Deneysel bir murin membranöz nefropati modelinde, resveratrol verilen murinlerde proteinürinin önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (394). Diyabetik nefropatili hastalara resveratrol ve anjiyotensin reseptör blokerinin birlikte verildiği klinik bir çalışmada idrar albümin atılımını azaltmak için anjiyotensin reseptör blokerlerine etkili bir yardımcı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (395). Öte yandan yapılan çalışmalarda metformin ile diyabetik olmayan kronik glomerüler fare modelinde proteinüri, glomerüler

skleroz ve kronik böbrek hastalığı fenotipini iyileştirdiği (396) ve hipertansif sıçanlarda HIF-2 α -VEGF-A yolunu aktive ederek proteinüriyi azalttığı gösterilmiştir (397). Anılan çalışmalarda metforminin anti-proteinürik etkisi inflamasyonu baskılamasına, matriks ve metabolik rüglasyonu sağlamasına, p-AMPK, p-p53, NRF2 gibi böbrek koruyucu faktörleri aktive etmesine ve apoptozisi azaltmasına bağlanmıştır (398). Resveratrol ve metformin ile proteinüride saptadığımız düzelme literatür bilgileri ile uyumludur. Yukarıdaki çalışmalarda resveratrol ve metformin ile ortaya çıkan olumlu etki multifaktöriyel olduğu (immünomodülatör, anti-oksidan, anti-inflamatuar) ve apoptozisin de katkısı olduğu ifade edilmişse de çalışmamız bu görüşü desteklememektedir. Çalışmamız sonuçlarında renal dokuda apoptozis varlığını destekleyen herhangi bir bulgu saptanmamıştır.

Sonuç olarak deney ölçümlerimiz ve böbrek dokusunda patolojik olarak kanıtladığımız iyileşmeler bir bütün olarak ele alındığında, resveratrol ve metforminin immun supresif (steroidler, MMF, siklosporin, rituximab vb) tedavilerinin yanında destek tedavileri olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Metformin tedavisinin total protein miktarını artırması, idrar protein atılımını resveratrole göre daha iyi kontrol etmesi, hem glomerüler hem de interstisyel hasarı iyileştirmesi göz önüne alındığında, metforminin destek tedavisi için daha önemli olduğu söylenebilir. Resveratrol ve metforminin nefrotik sendromdaki etkinliğini ve hücrel sinyal mekanizmalarını ortaya çıkaracak klinik ve laboratuvar araştırmalarına ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

Nefrotik sendrom (NS) masif proteinüri, hipoalbüminemi ve hiperkolesterolemi ile karakterize bir hastalıktır ve çocukluk çağında böbrek yetmezliğinin önemli bir nedenidir. NS patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, böbrek dokusundaki apoptozis önemli bir hasar mekanizması olabilir. Ancak NS’de ortaya çıkan apoptozis ile ilişkili anti-apoptotik proteinlerin böbrek doku düzeylerindeki değişimler ve bu proteinlere etkili olabilecek tedavi yöntemleri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada adriamisin ile oluşturulan nefrotik sendromlu sıçanlarda anti-apoptotik survivin ve XIAP proteinleri ile pro-apoptotik kaspaz-3’ün böbrek ve serum düzeyleri ve bu düzeylerin resveratrol ve metformin tedavileri ile değişimleri araştırılmıştır. Deneyimiz ile aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- 1- Survivin, XIAP ve kaspaz-3’ün renal doku düzeyleri tedavi edilmeyen sıçanlarda kontrol grubu ile benzerdi. Bu sonuçlar adriamisin ile oluşturulan nefrotik sendromda renal dokuda apoptozisin olmayabileceğini göstermektedir.
- 2- Resveratrol ve metformin ile tedavi edilen sıçanların renal doku survivin değerleri, tedavisiz gruba göre, istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. Survivin anti-apoptotik ve anti mitotik etkileri göz önüne alındığında, resveratrol ve metforminin nefrotik

sendrom böbrek dokusunda pro-apoptotik ve/veya renal proliferasyon gösteren hücreler için anti-mitotik bir etkinlik gösterebileceği düşünülebilir.

- 3- Nefrotik sendromlu sıçanların serum survivin ve XIAP düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Serum kaspaz-3 düzeyleri ise kontrol grubuna göre düşüktü istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü. Bu bulgular adriamisin ile oluşturulan nefrotik sendromda kanda, hematopoetik hücrelerde (olasılıkla lökositleri etkileyen) apoptozis olduğunu desteklemektedir.
- 4- Resveratrol ve metformin tedavileri, eşit derecede olmak üzere, tedavisiz sıçanlara göre serum kaspaz-3 düzeylerini artırarak kontrol grubu ile benzer hale getirdi. Sonuçlarımız resveratrol ve metforminin nefrotik sendromlu sıçan hematopoetik hücrelerinde pro-apoptotik etkiler gösterdiğine işaret etmektedir.
- 5- Resveratrol ve metformin tedavilerinin nefrotik sendromda oluşan hiperlipidemiye düzeltici etkilerinin olmadığı belirlendi.
- 6- Resveratrol ve metformin tedavileri ile tedavisiz sıçan böbrek dokusunda izlenen iskemik kollapsın hiçbir nefrotik sıçanda görülmediği ve glomerüler hasarın istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı. Metformin tedavisi ile ayrıca interstisyel hasarlanma da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı.
- 7- Resveratrol ve metforminin tedavileri iskemik kollaps gelişmesini önledi.
- 8- Resveratrol ve metformin tedavilerinin tübüler hasarı azaltmadığı görüldü.
- 9- Resveratrol ve metformin tedavileri ile deney sonucunda ölçülen proteinüri düzeylerinde 4.haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğu saptandı. Tedavi edilmeyen sıçanlarda ise proteinürinin artmaya devam ettiği belirlendi.

10-Resveratrol iskemik kollapsı önlemesi, glomerüler hasarı ve proteinüriyi azaltması nedeni ile nefrotik sendromlu hastalarda immunsupresif ilaçlarla birlikte kullanımının klinikte yararlı etkilere yol açabileceği sonucuna ulaşıldı. Metforminin resveratrolün oluşturduğu bütün bu etkileri oluşturması ve interstisyel hasarı da iyileştirmesi, metforminin destek tedavisi için alternatif daha etkili bir ilaç olabileceğini düşündürmektedir.



KAYNAKLAR

1. S. Agrawal, J. J. Zaritsky, A. Fornoni, and W. E. Smoyer, "Dyslipidaemia in nephrotic syndrome: mechanisms and treatment," *Nat. Rev. Nephrol.*, 14, 1, 57, Dec. 2018, doi:10.1038/NRNEPH.2017.155.
2. R. W. Keane, S. Kraydieh, G. Lotocki, *et al.*, "Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60, 5, 422–429, 2001, doi: 10.1093/JNEN/60.5.422.
3. I. K. H. Poon, C. D. Lucas, A. G. Rossi, and K. S. Ravichandran, "Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential," *Nat. Rev. Immunol.*, 14, 3, 166–180, Mar. 2014, doi: 10.1038/NRI3607.
4. P. Schneider and J. Tschopp, "Apoptosis induced by death receptors," *Pharm. Acta Helv.*, 74, 2–3, 281–286, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0031-6865(99)00038-2.
5. N. Van Opdenbosch and M. Lamkanfi, "Caspases in cell death, inflammation and disease," *Immunity*, 50, 6, 1352, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2019.05.020.
6. L. Galluzzi, A. López-Soto, S. Kumar, and G. Kroemer, "Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis," *Immunity*, 44, 2, 221–231, Feb. 2016, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2016.01.020.
7. N. A. Thornberry and Y. Lazebnik, "Caspases: enemies within," *Science*, 281, 5381, 1312–1316, Aug. 1998, doi: 10.1126/SCIENCE.281.5381.1312.
8. D. R. Green, "Apoptotic pathways: ten minutes to dead," *Cell*, 121, 5, 671–674, Jun. 2005, doi: 10.1016/J.CELL.2005.05.019.
9. N. Kindt, A. Menzebach, M. Van de Wouwer, *et al.*, "Protective role of the inhibitor of apoptosis protein, survivin, in toxin-induced acute renal failure," *FASEB J.*, 22, 2, 510–521, Feb. 2008, doi: 10.1096/FJ.07-8882COM.
10. D. J. Den Hartogh and E. Tsiani, "Health Benefits of Resveratrol in Kidney Disease: Evidence from In Vitro and In Vivo Studies," *Nutrients*, 11, 7, Jul. 2019, doi: 10.3390/NU11071624.
11. P. Breining, J. B. Jensen, E. I. Sundelin, *et al.*, "Metformin targets brown adipose tissue in vivo and reduces oxygen consumption in vitro," *Diabetes. Obes. Metab.*, 20, 9, 2264–2273, Sep. 2018, doi: 10.1111/DOM.13362.
12. A. I. Morales, D. Dettaille, M. Prieto, *et al.*, "Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway," *Kidney Int.*, 77, 10, 861–869, 2010, doi: 10.1038/KI.2010.11.
13. M. L. Downie, C. Gallibois, R. S. Parekh, and D. G. Noone, "Nephrotic syndrome in infants and children: pathophysiology and management," <https://doi.org/10.1080/20469047.2017.1374003>, 37, 4, 248–258, Sep. 2017, doi: 10.1080/20469047.2017.1374003.
14. C. Tapia and K. Bashir, "Nephrotic Syndrome," *StatPearls*, Aug. 2021, Accessed: Apr. 07, 2022. Available:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470444/>

15. P. Niaudet, "Long-term outcome of children with steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 4,10, 1547–1548, 2009, doi: 10.2215/CJN.05950809.
16. C. shi Wang and L. A. Greenbaum, "Nephrotic Syndrome," *Pediatr. Clin. North Am.*, 66, 1, 73–85, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.PCL.2018.08.006.
17. H. Ruder, K. Schärer, G. Opelz, *et al.*, "Human leucocyte antigens in idiopathic nephrotic syndrome in children," *Pediatr. Nephrol.*, 4, 5, 478–481, 1990, doi: 10.1007/BF00869824.
18. T. H. M. Banh, N. Hussain-Shamsy, V. Patel, *et al.*, "Ethnic Differences in Incidence and Outcomes of Childhood Nephrotic Syndrome," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 11, 10, 1760–1768, Oct. 2016, doi: 10.2215/CJN.00380116.
19. G. C. Arneil, "The nephrotic syndrome," *Pediatr. Clin. North Am.*, 18, 2, 547–559, 1971, doi: 10.1016/S0031-3955(16)32565-2.
20. "Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children," *Kidney Int.*, 13, 2, 159–165, 1978, doi: 10.1038/KI.1978.23.
21. S. A. Politano, G. B. Colbert, and N. Hamiduzzaman, "Nephrotic Syndrome," *Prim. Care Clin. Off. Pract.*, 47, 4, 597–613, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.POP.2020.08.002.
22. W. Bilinska, A. Rogowska-Kalisz, B. Puczeko-Nogal, and M. Nowicki, "Congenital nephrotic syndrome," *Med. Wieku Rozwoj.*, 6, 2, 89–98, 2002, doi: 10.32388/wcl8tr.
23. M. Vivarelli, L. Massella, B. Ruggiero, and F. Emma, "Minimal Change Disease," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 12, 2, 332, 2017, doi: 10.2215/CJN.05000516.
24. M. L. Downie, C. Gallibois, R. S. Parekh, and D. G. Noone, "Nephrotic syndrome in infants and children: pathophysiology and management," *Paediatr. Int. Child Health*, 37, 4, 248–258, Sep. 2017, doi: 10.1080/20469047.2017.1374003.
25. S. E. Wenderfer and K. W. Eldin, "Lupus Nephritis," *Pediatr. Clin. North Am.*, 66, 1, 87–99, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.pcl.2018.08.007.
26. F. Wang, Y. Zhang, J. Mao, *et al.*, "Spectrum of mutations in Chinese children with steroid-resistant nephrotic syndrome," *Pediatr. Nephrol.*, 32, 7, 1181–1192, Jul. 2017, doi: 10.1007/S00467-017-3590-Y.
27. A. Trautmann, M. Vivarelli, S. Samuel, *et al.*, "IPNA clinical practice recommendations for the diagnosis and management of children with steroid-resistant nephrotic syndrome," *Pediatr. Nephrol.*, 35, 8, 1529–1561, Aug. 2020, doi: 10.1007/S00467-020-04519-1.
28. D. G. Noone, K. Iijima, and R. Parekh, "Idiopathic nephrotic syndrome in children," *Lancet*, 392,10141, 61–74, Jul. 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)30536-1.
29. G. T. M. Sales and R. D. Foresto, "Drug-induced nephrotoxicity," *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 66, 1, s82–s90, 2020, doi: 10.1590/1806-9282.66.S1.82.

30. A. Trautmann, M. Vivarelli, S. Samuel, *et al.*, "IPNA clinical practice recommendations for the diagnosis and management of children with steroid-resistant nephrotic syndrome," *Pediatr. Nephrol.*, 35, 8, 1529, Aug. 2020, doi: 10.1007/S00467-020-04519-1.
31. A. Meyrier and P. Niaudet, "Acute kidney injury complicating nephrotic syndrome of minimal change disease," *Kidney Int.*, vol. 94, 5, 861–869, Nov. 2018, 10.1016/J.KINT.2018.04.024.
32. G. Zamora and A. L. Pearson-Shaver, "Minimal Change Disease," *StatPearls*, Aug. 2021, Accessed: May 04, 2022. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560639/>
33. K. N. Campbell and J. A. Tumlin, "Protecting Podocytes: A Key Target for Therapy of Focal Segmental Glomerulosclerosis," *Am. J. Nephrol.*, 47, Suppl 1,14, Jun. 2018, doi: 10.1159/000481634.
34. A. Z. Rosenberg and J. B. Kopp, "Focal Segmental Glomerulosclerosis," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 12, 3, 502–517, 2017, doi: 10.2215/CJN.05960616.
35. J. Kiffel, Y. Rahimzada, and H. Trachtman, "Focal segmental glomerulosclerosis and chronic kidney disease in pediatric patients," *Adv. Chronic Kidney Dis.*, 18, 5, 332–338, Sep. 2011, doi: 10.1053/J.ACKD.2011.03.005.
36. H. Trachtman, "Emerging drugs for treatment of focal segmental glomerulosclerosis," *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 25, 3, 367, Jul. 2020, doi: 10.1080/14728214.2020.1803276.
37. J. Bai, L. Wu, X. Chen, *et al.*, "Suppressor of Cytokine Signaling-1/STAT1 Regulates Renal Inflammation in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis Models," *Front. Immunol.*, 9, Aug, 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.01982/
38. L. Xu, F. Wei, J. Feng, *et al.*, "Characteristics and outcomes of glomerulonephritis with membranoproliferative pattern in children," *Transl. Pediatr.*, 10, 11, 2985, Nov. 2021, doi: 10.21037/TP-21-286.
39. I. Agrebi, K. Kammoun, N. Dammak, *et al.*, "Primary membranoproliferative glomerulonephritis in Sfax, Tunisia: epidemiologic profile and prognostic factors," *Pan Afr. Med. J.*, 38, 218, 2021, doi: 10.11604/PAMJ.2021.38.218.21059.
40. I. Agrebi, K. Kammoun, N. Dammak, *et al.*, "Primary membranoproliferative glomerulonephritis in Sfax, Tunisia: epidemiologic profile and prognostic factors," *Pan Afr. Med. J.*, 38, 218, 2021, doi: 10.11604/PAMJ.2021.38.218.21059.
41. M. M. O'Shaughnessy, S. L. Hogan, C. J. Poulton, *et al.*, "Temporal and Demographic Trends in Glomerular Disease Epidemiology in the Southeastern United States, 1986-2015," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 12, 4, 614–623, 2017, doi: 10.2215/CJN.10871016.
42. J. G. Heaf, S. S. Sørensen, and A. Hansen, "Increased incidence and improved prognosis of glomerulonephritis: a national 30-year study," *Clin. Kidney J.*, 14, 6, 1594–1602, May 2020, doi: 10.1093/CKJ/SFAA169.
43. R. J. H. Smith, J. Alexander, P. N. Barlow, *et al.*, "New approaches to the treatment of dense deposit disease," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18,

- no. 9, pp. 2447–2456, Sep. 2007, doi: 10.1681/ASN.2007030356.
44. M. Noris, E. Daina, and G. Remuzzi, “Membranoproliferative glomerulonephritis: no longer the same disease and may need very different treatment,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, 0, 1–8, Oct. 2021, doi: 10.1093/NDT/GFAB281.
 45. “Prevalence and incidence of rare diseases: Bibliographic data”, Accessed: May 09, 2022. Available: www.orpha.net
 46. P. Iatropoulos, M. Noris, C. Mele, *et al.*, “Complement gene variants determine the risk of immunoglobulin-associated MPGN and C3 glomerulopathy and predict long-term renal outcome,” *Mol. Immunol.*, 71, 131–142, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.MOLIMM.2016.01.010.
 47. P. Iatropoulos, E. Daina, M. Curreri, *et al.*, “Cluster Analysis Identifies Distinct Pathogenetic Patterns in C3 Glomerulopathies/Immune Complex-Mediated Membranoproliferative GN,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, 29, 1, 283–294, Jan. 2018, doi: 10.1681/ASN.2017030258.
 48. W. Couser, “Primary membranous nephropathy,” *Clin J Am Soc Nephrol*, 12, 983–997, 2017.
 49. Y. Gu, H. Xu, and D. Tang, “Mechanisms of Primary Membranous Nephropathy,” *Biomolecules*, 11, 4, 2021, doi: 10.3390/BIOM11040513.
 50. R. A. Sinico, N. Mezzina, B. Trezzi, G. M. Ghiggeri, and A. Radice, “Immunology of membranous nephropathy: from animal models to humans,” *Clin. Exp. Immunol.*, 183, 2, 157–165, Feb. 2016, doi: 10.1111/CEI.12729.
 51. W. G. Couser, “Primary Membranous Nephropathy,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 12, 6, 983, 2017, doi: 10.2215/CJN.11761116.
 52. R. Preston, H. M. Stuart, and R. Lennon, “Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: why, who, when and how?,” *Pediatr. Nephrol.*, 34, 2, 195, Feb. 2019, doi: 10.1007/S00467-017-3838-6.
 53. M. J. Kemper, L. Valentin, and M. van Husen, “Difficult-to-treat idiopathic nephrotic syndrome: established drugs, open questions and future options,” *Pediatr. Nephrol.*, 33, 10, 1641–1649, Oct. 2018, doi: 10.1007/S00467-017-3780-7.
 54. K. Tullus, H. Webb, and A. Bagga, “Management of steroid-resistant nephrotic syndrome in children and adolescents,” *Lancet Child Adolesc. Heal.*, 2, 12, 880–890, Dec. 2018, doi: 10.1016/S2352-4642(18)30283-9.
 55. H. Il Cheong, “Genetic tests in children with steroid-resistant nephrotic syndrome,” *Kidney Res. Clin. Pract.*, 39, 1, 7, 2020, doi: 10.23876/J.KRCP.20.001.
 56. J. Chen, X. H. Qiao, and J. H. Mao, “Immunopathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome in children: two sides of the coin,” *World J. Pediatr.*, 17, 2, 115–122, Apr. 2021, doi: 10.1007/S12519-020-00400-1/
 57. A. Trautmann, S. Schnaidt, B. S. Lipska-Ziğtkiewicz, *et al.*, “Long-Term Outcome of Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome in Children,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, 28, 10, 3055–3065, Oct. 2017, doi: 10.1681/ASN.2016101121.

58. J. B. Jain and S. Chauhan, "Congenital Nephrotic Syndrome," *StatPearls*, Jun. 2021, Accessed: Apr. 07, 2022. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572058/>
59. J. B. Jain and S. Chauhan, "Congenital Nephrotic Syndrome," *StatPearls*, 2022, Accessed: Apr. 07, 2022. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34283424/>
60. R. J. Shalhoub, "Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function," *Lancet (London, England)*, 2, 7880, 556–560, Sep. 1974, doi: 10.1016/S0140-6736(74)91880-7.
61. V. A. Taylor, H. K. Stone, M. P. Schuh, *et al.*, "Disarranged Sphingolipid Metabolism From Sphingosine-1-Phosphate Lyase Deficiency Leads to Congenital Nephrotic Syndrome," *Kidney Int. reports*, 4, 12, 1763–1769, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.EKIR.2019.07.018.
62. B. L. Wharram, M. Goyal, J. E. Wiggins, *et al.*, "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, 2005, doi: 10.1681/ASN.2005010055.
63. O. Akchurin and K. J. Reidy, "Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: impact on podocyte pathobiology," *Pediatr. Nephrol.*, 30, 2, 221–233, Mar. 2015, doi: 10.1007/S00467-014-2753-3.
64. J. G. Van Den Berg and J. J. Weening, "Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome," *Clin. Sci. (Lond.)*, 107, 2, 125–136, Aug. 2004, doi: 10.1042/CS20040095.
65. V. Audard, F. Larousserie, P. Grimberty, *et al.*, "Minimal change nephrotic syndrome and classical Hodgkin's lymphoma: report of 21 cases and review of the literature," *Kidney Int.*, 69, 12, 2251–2260, Jun. 2006, doi: 10.1038/SJ.KI.5000341.
66. C. Y. Lin and H. C. Hsu, "Histopathological and immunological studies in spontaneous remission of nephrotic syndrome after intercurrent measles infection," *Nephron*, 42, 2, 110–115, 1986, doi: 10.1159/000183647.
67. R. J. Shalhoub, "Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function," *Lancet (London, England)*, 2, 7880, 556–560, Sep. 1974, doi: 10.1016/S0140-6736(74)91880-7.
68. K. Iijima, D. M. Sako, K. Nozu, *et al.*, "Rituximab for childhood-onset, complicated, frequently relapsing nephrotic syndrome or steroid-dependent nephrotic syndrome: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial," *Lancet (London, England)*, 384, 9950, 1273–1281, 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(14)60541-9.
69. "IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9310469/> (accessed Jul. 04, 2022).
70. K. Kamei, S. Ito, K. Nozu, *et al.*, "Single dose of rituximab for refractory steroid-dependent nephrotic syndrome in children," *Pediatr. Nephrol.*, 24, 7, 1321–1328, 2009, doi: 10.1007/S00467-009-1191-0.

71. M. Colucci, R. Carsetti, S. Cascioli, *et al.*, "B cell reconstitution after rituximab treatment in idiopathic nephrotic syndrome," *J. Am. Soc. Nephrol.*, 27, 6, 1811–1822, Jun. 2016, doi: 10.1681/ASN.2015050523/
72. R. J. M. Bashford-Rogers, L. Bergamaschi, E. F. McKinney, *et al.*, "Analysis of the B cell receptor repertoire in six immune-mediated diseases," *Nature*, 574, 7776, 122–126, Oct. 2019, doi: 10.1038/S41586-019-1595-3.
73. T. H. Yoo and A. Fornoni, "Nonimmunologic targets of immunosuppressive agents in podocytes," *Kidney Res. Clin. Pract.*, 34, 2, 69–75, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.KRCP.2015.03.003.
74. A. Fornoni, J. Sageshima, C. Wei, *et al.*, "Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis," *Sci. Transl. Med.*, 3, 85, Jun. 2011, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.3002231.
75. M. Vivarelli, M. Colucci, A. Bonanni, *et al.*, "Ofatumumab in two pediatric nephrotic syndrome patients allergic to rituximab," *Pediatr. Nephrol.* 2016 321, 32, 1, 181–184, Sep. 2016, doi: 10.1007/S00467-016-3498-Y.
76. M. L. Alegre, K. A. Frauwirth, and C. B. Thompson, "T-cell regulation by CD28 and CTLA-4," *Nat. Rev. Immunol.*, 1, 3, 220–228, 2001, doi: 10.1038/35105024.
77. G. Cara-Fuentes, M. Venkatarreddy, R. Verma, *et al.*, "Glomerular endothelial cells and podocytes can express CD80 in patients with minimal change disease during relapse," *Pediatr. Nephrol.*, 35, 10, 1887–1896, Oct. 2020, doi: 10.1007/S00467-020-04541-3.
78. A. M. Gonzalez Guerrico, J. Lieske, G. Klee, *et al.*, "Urinary CD80 Discriminates Among Glomerular Disease Types and Reflects Disease Activity," *Kidney Int. reports*, 5, 11, 2021–2031, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.EKIR.2020.08.001.
79. A. Goldwich, M. Burkard, M. Ölke, *et al.*, "Podocytes are nonhematopoietic professional antigen-presenting cells," *J. Am. Soc. Nephrol.*, 24, 6, 906–916, May 2013, doi: 10.1681/ASN.2012020133/
80. J. Neefjes, M. L. M. Jongsma, P. Paul, and O. Bakke, "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation," *Nat. Rev. Immunol.*, 11, 12, 823–836, Dec. 2011, doi: 10.1038/NRI3084.
81. N. Arase and H. Arase, "Cellular misfolded proteins rescued from degradation by MHC class II molecules are possible targets for autoimmune diseases," *J. Biochem.*, 158, 5, 367–372, Aug. 2015, doi: 10.1093/JB/MVV093.
82. T. Horinouchi, K. Nozu, and K. Iijima, "An updated view of the pathogenesis of steroid-sensitive nephrotic syndrome," *Pediatr. Nephrol.*, 1, 1–9, Jan. 2022, doi: 10.1007/S00467-021-05401-4/TABLES/1.
83. J. Reiser, G. Von Gersdorff, M. Loos, *et al.*, "Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome," *J. Clin. Invest.*, 113, 10, 1390–1397, 2004, doi: 10.1172/JCI20402.
84. R. Furie, K. Nicholls, T. T. Cheng, *et al.*, "Efficacy and safety of abatacept in lupus nephritis: a twelve-month, randomized, double-blind

- study," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, 66, 2, 379–389, 2014, doi: 10.1002/ART.38260.
85. C. Haslett, "Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes," *Clin. Sci. (Lond)*., 83, 6, 639–648, 1992, doi: 10.1042/CS0830639.
 86. J. K. J. Deegens, M. B. Andresdottir, S. Croockewit, and J. F. M. Wetzels, "Plasma exchange improves graft survival in patients with recurrent focal glomerulosclerosis after renal transplant," *Transpl. Int.*, 17, 3, 151–157, Mar. 2004, doi: 10.1007/S00147-003-0679-Y.
 87. V. J. Savin, R. Sharma, M. Sharma, *et al.*, "Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis," *N. Engl. J. Med.*, 334, 14, 878–883, Apr. 1996, doi: 10.1056/NEJM199604043341402.
 88. M. J. Kemper, G. Wolf, and D. E. Müller-Wiefel, "Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child," *N. Engl. J. Med.*, 344, 5, 386–387, Feb. 2001, doi: 10.1056/NEJM200102013440517.
 89. L. Gallon, J. Leventhal, A. Skaro, Y. Kanwar, and A. Alvarado, "Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after retransplantation," *N. Engl. J. Med.*, 366, 17, 1648–1649, Apr. 2012, doi: 10.1056/NEJMC1202500.
 90. S. Tomizawa, K. Maruyama, N. Nagasawa, S. Suzuki, and T. Kuroume, "Studies of vascular permeability factor derived from T lymphocytes and inhibitory effect of plasma on its production in minimal change nephrotic syndrome," *Nephron*, 41, 2, 157–160, 1985, doi: 10.1159/000183572.
 91. R. Lennon, A. Singh, G. I. Welsh, *et al.*, "Hemopexin induces nephrin-dependent reorganization of the actin cytoskeleton in podocytes," *J. Am. Soc. Nephrol.*, 19, 11, 2140–2149, Nov. 2008, doi: 10.1681/ASN.2007080940.
 92. V. J. Savin, E. T. McCarthy, R. Sharma, D. Charba, and M. Sharma, "Galactose binds to focal segmental glomerulosclerosis permeability factor and inhibits its activity," *Transl. Res.*, 151, 6, 288–292, 2008, doi: 10.1016/J.TRSL.2008.04.001.
 93. E. T. McCarthy, M. Sharma, and V. J. Savin, "Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 5, 11, 2115–2121, Nov. 2010, doi: 10.2215/CJN.03800609.
 94. C. Wei, S. El Hindi, J. Li, *et al.*, "Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis," *Nat. Med.*, 17, 8, 952–960, Aug. 2011, doi: 10.1038/NM.2411.
 95. B. Meijers, R. J. H. Maas, B. Sprangers, *et al.*, "The soluble urokinase receptor is not a clinical marker for focal segmental glomerulosclerosis," *Kidney Int.*, 85, 3, 636–640, 2014, doi: 10.1038/KI.2013.505.
 96. A. Sinha, J. Bajpai, S. Saini, *et al.*, "Serum-soluble urokinase receptor levels do not distinguish focal segmental glomerulosclerosis from other causes of nephrotic syndrome in children," *Kidney Int.*, 85, 3, 649–658,

- 2014, doi: 10.1038/KI.2013.546.
97. A. Bierzynska, H. J. McCarthy, K. Soderquest, *et al.*, "Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management," *Kidney Int.*, 91, 4, 937–947, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.KINT.2016.10.013.
 98. S. Giglio, A. Provenzano, B. Mazzinghi, *et al.*, "Heterogeneous genetic alterations in sporadic nephrotic syndrome associate with resistance to immunosuppression," *J. Am. Soc. Nephrol.*, 26, 1, 230–236, Jan. 2015, doi: 10.1681/ASN.2013111155/-DCSUPPLEMENTAL.
 99. Y. Y. Jin, B. Y. Feng, and J. H. Mao, "The status quo and challenges of genetic diagnosis in children with steroid-resistant nephrotic syndrome," *World J. Pediatr.* 2018 142, 14,2, 105–109, Apr. 2018, doi: 10.1007/S12519-018-0156-4.
 100. A. Trautmann, S. Schnaidt, B. S. Lipska-Ziğtkiewicz, *et al.*, "Long-term outcome of steroid-resistant nephrotic syndrome in children," *J. Am. Soc. Nephrol.*, 28, 10, 3055–3065, Oct. 2017, doi: 10.1681/ASN.2016101121/
 101. Y. Harita, "Application of next-generation sequencing technology to diagnosis and treatment of focal segmental glomerulosclerosis," *Clin. Exp. Nephrol.*, 22, 3, 491–500, Jun. 2018, doi: 10.1007/S10157-017-1449
 102. M. L. Downie, C. Gallibois, R. S. Parekh, and D. G. Noone, "Nephrotic syndrome in infants and children: pathophysiology and management," <https://doi.org/10.1080/20469047.2017.1374003>, 37, 4, 248–258, Sep. 2017, doi: 10.1080/20469047.2017.1374003.
 103. T. P. Andolino and J. Reid-Adam, "Nephrotic syndrome," *Pediatr. Rev.*, 36, 3, 117–126, Mar. 2015, doi: 10.1542/PIR.36-3-117.
 104. P. Hari, P. Khandelwal, and W. E. Smoyer, "Dyslipidemia and cardiovascular health in childhood nephrotic syndrome," *Pediatr. Nephrol.*, 35, 9, 1601–1619, Sep. 2020, doi: 10.1007/S00467-019-04301-Y.
 105. E. Rodriguez-Ballestas and J. Reid-Adam, "Nephrotic Syndrome," *Pediatr. Rev.*, 43, 2, 87–99, Feb. 2022, doi: 10.1542/PIR.2020-001230.
 106. M. Manta and S. Singh, "Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation," *Saudi J. Kidney Dis. Transplant.*, 30, 6, 1245, Nov. 2019, doi: 10.4103/1319-2442.275468.
 107. O. Boyer, F. Schaefer, D. Haffner, *et al.*, "Management of congenital nephrotic syndrome: consensus recommendations of the ERKNet-ESPN Working Group," *Nat. Rev. Nephrol.*, 17, 4, 277, Apr. 2021, doi: 10.1038/S41581-020-00384-1.
 108. S. R. Hingorani, N. S. Weiss, and S. L. Watkins, "Predictors of peritonitis in children with nephrotic syndrome," *Pediatr. Nephrol.*, 17, 8, 678–682, 2002, doi: 10.1007/S00467-002-0890-6.
 109. A. Pasini, E. Benetti, G. Conti, *et al.*, "The Italian Society for Pediatric Nephrology (SINePe) consensus document on the management of nephrotic syndrome in children: Part I - Diagnosis and treatment of the first episode and the first relapse," *Ital. J. Pediatr.*, 43, 1, Apr. 2017, doi: 10.1186/S13052-017-0356-X.

110. S. Sinha, A. T. K. Rau, R. V. Kumar, C. Jayadev, and A. Vinekar, "Bilateral combined central retinal artery and vein occlusion in a 3-year-old child with nephrotic syndrome," *Indian J. Ophthalmol.*, 66, 10, 1498–1501, Oct. 2018, doi: 10.4103/IJO.IJO_1332_17.
111. S. Fujinaga and K. Sakuraya, "Spontaneous femoral artery thrombosis in childhood-onset nephrotic syndrome," *Pediatr. Int.*, 61, 5, 526–527, May 2019, doi: 10.1111/PED.13842.
112. W. Sharp and J. J. Olivero, "Venous Thrombosis in Nephrotic Syndrome," *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.*, vol. 14, no. 3, pp. 237–238, Jul. 2018, doi: 10.14797/MDCJ-14-3-237.
113. C. B. Sethna, K. Merchant, and A. Reyes, "Cardiovascular Disease Risk in Children With Kidney Disease," *Semin. Nephrol.*, vol. 38, no. 3, pp. 298–313, May 2018, doi: 10.1016/J.SEMNEPHROL.2018.02.009.
114. M. N. Rheault, L. Zhang, D. T. Selewski, et al., "AKI in Children Hospitalized with Nephrotic Syndrome," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 10, no. 12, pp. 2110–2118, Dec. 2015, doi: 10.2215/CJN.06620615.
115. J. M. Lee, A. Kronbichler, J. Il Shin, and J. Oh, "Review on long-term non-renal complications of childhood nephrotic syndrome," *Acta Paediatr.*, vol. 109, no. 3, pp. 460–470, Mar. 2020, doi: 10.1111/APA.15035.
116. "Dipstick Method versus Spot Urinary Protein Creatinine Ratio for Evaluation of Massive Proteinuria in Childhood Nephrotic Syndrome - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29769504/> (accessed May 24, 2022).
117. N. S. Deshpande, R. Tewari, S. Badwal, S. Mendonca, and R. Bharadwaj, "Evaluation of cases of membranoproliferative glomerulonephritis according to newer classification: A retrospective record-based study," *Med. journal, Armed Forces India*, vol. 74, no. 3, pp. 264–267, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.MJAFI.2017.01.008.
118. C. Holmberg and H. Jalanko, "[Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type--key to the mechanisms of proteinuria]," *Duodecim.*, vol. 127, no. 10, pp. 1017–1025, 2011, Accessed: Jun. 29, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21696001/>
119. N. Boute, O. Gribouval, S. Roselli, et al., "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome," *Nat. Genet.*, vol. 24, no. 4, pp. 349–354, Apr. 2000, doi: 10.1038/74166.
120. R. H. R. White, E. F. Glasgow, and R. J. Mills, "Clinicopathological study of nephrotic syndrome in childhood," *Lancet (London, England)*, vol. 1, no. 7661, pp. 1353–1359, Jun. 1970, doi: 10.1016/S0140-6736(70)91268-7.
121. P. Niaudet, "Treatment of childhood steroid-resistant idiopathic nephrosis with a combination of cyclosporine and prednisone. French Society of Pediatric Nephrology," *J. Pediatr.*, vol. 125, no. 6 Pt 1, pp. 981–986, 1994, doi: 10.1016/S0022-3476(05)82020-7.
122. J. P. Kassirer, "Is renal biopsy necessary for optimal management of the idiopathic nephrotic syndrome?," *Kidney Int.*, vol. 24, no. 4, pp. 561–575, Oct. 1983, doi: 10.1038/KI.1983.194.

123. F. I. Abbag and J. M. Al Qahtani, "Extreme elevation of the erythrocyte sedimentation rate in children," *Ann. Saudi Med.*, vol. 27, no. 3, pp. 175–178, 2007, doi: 10.5144/0256-4947.2007.175.
124. "The significance of extreme elevation of the erythrocyte sedimentation rate in hemodialysis patients - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17660652/> (accessed Jun. 29, 2022).
125. R. Ehren, M. R. Benz, P. T. Brinkkötter, *et al.*, "Pediatric idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome: diagnosis and therapy —short version of the updated German best practice guideline (S2e) — AWMF register no. 166-001, 6/2020," *Pediatr. Nephrol.*, vol. 36, no. 10, p. 2971, Oct. 2021, doi: 10.1007/S00467-021-05135-3.
126. S. Gulati, A. P. Sharma, R. K. Sharma, A. Gupta, and R. K. Gupta, "Do current recommendations for kidney biopsy in nephrotic syndrome need modifications?," *Pediatr. Nephrol.*, vol. 17, no. 6, pp. 404–408, 2002, doi: 10.1007/S00467-002-0840-3.
127. M. Haas, S. M. Meehan, T. G. Karrison, and B. H. Spargo, "Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 30, no. 5, pp. 621–631, 1997, doi: 10.1016/S0272-6386(97)90485-6.
128. K. J. Hampson, M. L. Gay, and M. E. Band, "Pediatric Nephrotic Syndrome: Pharmacologic and Nutrition Management," *Nutr. Clin. Pract.*, vol. 36, no. 2, pp. 331–343, Apr. 2021, doi: 10.1002/NCP.10622.
129. D. Cattran, J. Feehally, H. C.-I., and undefined 2012, "Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) glomerulonephritis work group. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis," *mayoclinic.pure.elsevier.com*, Accessed: May 18, 2022. [Online]. Available: <https://mayoclinic.pure.elsevier.com/en/publications/kidney-disease-improving-global-outcomes-kdigo-glomerulonephritis>
130. J. M. Lee, A. Kronbichler, J. Il Shin, and J. Oh, "Current understandings in treating children with steroid-resistant nephrotic syndrome," *Pediatr. Nephrol.*, vol. 36, no. 4, pp. 747–761, Apr. 2021, doi: 10.1007/S00467-020-04476-9.
131. S. Dogra and F. Kaskel, "Steroid-resistant nephrotic syndrome: a persistent challenge for pediatric nephrology," *Pediatr. Nephrol.*, vol. 32, no. 6, pp. 965–974, Jun. 2017, doi: 10.1007/S00467-016-3459-5.
132. T. Bertani, F. Cutillo, C. Zoja, M. Broggin, and G. Remuzzi, "Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy," *Kidney Int.*, vol. 30, no. 4, pp. 488–496, 1986, doi: 10.1038/KI.1986.212.
133. H. Inuzuka, S. Shaik, I. Onoyama, *et al.*, "SCFFBW7 regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction," *Nature*, vol. 471, no. 7336, pp. 104–109, Mar. 2011, doi: 10.1038/NATURE09732.
134. W. de F. Pereira, G. E. A. Brito-Melo, C. A. S. de Almeida, *et al.*, "The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents: an update," *Inflamm. Res.*, vol. 64, no. 5, pp. 287–301, May

- 2015, doi: 10.1007/S00011-015-0813-1/FIGURES/4.
135. V. W. Lee and D. C. Harris, "Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis," *Nephrology (Carlton)*, vol. 16, no. 1, pp. 30–38, Jan. 2011, doi: 10.1111/J.1440-1797.2010.01383.X.
 136. K. Kojima, K. Matsui, and M. Nagase, "Protection of alpha(3) integrin-mediated podocyte shape by superoxide dismutase in the puromycin aminonucleoside nephrosis rat," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 35, no. 6, pp. 1175–1185, 2000, doi: 10.1016/S0272-6386(00)70056-4.
 137. J. J. Weening and H. G. Rennke, "Glomerular permeability and polyanion in adriamycin nephrosis in the rat," *Kidney Int.*, vol. 24, no. 2, pp. 152–159, 1983, doi: 10.1038/KI.1983.139.
 138. S. Okuda, Y. Oh, H. Tsuruda, *et al.*, "Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease," *Kidney Int.*, vol. 29, no. 2, pp. 502–510, 1986, doi: 10.1038/KI.1986.28.
 139. "Pseudoductules in the rat liver in experimental adriamycin-induced nephrotic syndrome - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12898918/> (accessed Jun. 29, 2022).
 140. J. A. Bertolatus and L. G. Hunsicker, "Glomerular sieving of anionic and neutral bovine albumins in proteinuric rats," *Kidney Int.*, vol. 28, no. 3, pp. 467–476, 1985, doi: 10.1038/KI.1985.153.
 141. "Glomerular epithelial detachment, not reduced charge density, correlates with proteinuria in adriamycin and puromycin nephrosis - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2601299/> (accessed Jun. 29, 2022).
 142. M. Jeansson, K. Björck, O. Tenstad, and B. Haraldsson, "Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, no. 1, pp. 114–122, Jan. 2009, doi: 10.1681/ASN.2007111205.
 143. J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics," *Br. J. Cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 239–257, 1972, doi: 10.1038/BJC.1972.33.
 144. S. L. Fink and B. T. Cookson, "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells," *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 4, pp. 1907–1916, Apr. 2005, doi: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005.
 145. P. Kurowska, E. Mlyczynska, and A. Rak, "Effect of ghrelin on the apoptosis of various cells. A critical review," *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 70, no. 1, pp. 1–11, Feb. 2019, doi: 10.26402/JPP.2019.1.02.
 146. E. Obeng, "Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review," *Braz. J. Biol.*, vol. 81, no. 4, pp. 1133–1143, 2021, doi: 10.1590/1519-6984.228437.
 147. M. S. D'Arcy, "Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy," *Cell Biol. Int.*, vol. 43, no. 6, pp. 582–592, Jun. 2019, doi: 10.1002/CBIN.11137.
 148. S. Fulda, "Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 39, pp. 20–25, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2015.01.006.

149. S. Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, p. 495, 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
150. X. Xu, Y. Lai, and Z. C. Hua, "Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials," *Biosci. Rep.*, vol. 39, no. 1, p. 20180992, Jan. 2019, doi: 10.1042/BSR20180992.
151. B. Macchi, F. Marino-Merlo, U. Nocentini, *et al.*, "Role of inflammation and apoptosis in multiple sclerosis: Comparative analysis between the periphery and the central nervous system," *J. Neuroimmunol.*, vol. 287, pp. 80–87, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.JNEUROIM.2015.08.016.
152. M. Oropesa Ávila, A. Fernández Vega, J. Garrido Maraver, *et al.*, "Emerging roles of apoptotic microtubules during the execution phase of apoptosis," *Cytoskeleton*, vol. 72, no. 9, pp. 435–446, Sep. 2015, doi: 10.1002/CM.21254.
153. G. Häcker, "The morphology of apoptosis," *Cell Tissue Res.*, vol. 301, no. 1, pp. 5–17, 2000, doi: 10.1007/S004410000193.
154. S. Elmore, "Apoptosis: a review of programmed cell death," *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
155. X. Xu, Y. Lai, and Z. C. Hua, "Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials," *Biosci. Rep.*, vol. 39, no. 1, p. 20180992, Jan. 2019, doi: 10.1042/BSR20180992.
156. F. H. Igney and P. H. Krammer, "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 4, pp. 277–288, 2002, doi: 10.1038/NRC776.
157. R. W. Oppenheim, R. A. Flavell, S. Vinsant, *et al.*, "Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 13, pp. 4752–4760, Jul. 2001, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-13-04752.2001.
158. M. R. Elliott and K. S. Ravichandran, "Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease," *J. Cell Biol.*, vol. 189, no. 7, pp. 1059–1070, Jun. 2010, doi: 10.1083/JCB.201004096.
159. D. W. Dickson, "Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect?," *J. Clin. Invest.*, vol. 114, no. 1, pp. 23–27, 2004, doi: 10.1172/JCI22317.
160. R. S. Y. Wong, "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 30, no. 1, 2011, doi: 10.1186/1756-9966-30-87.
161. C. Batandier, X. Leverve, and E. Fontaine, "Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 17, pp. 17197–17204, Apr. 2004, doi: 10.1074/JBC.M310329200.
162. C. Du, M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang, "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition," *Cell*, vol. 102, no. 1, pp. 33–42, Jul. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)00008-8.
163. "The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy - PubMed."

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23070005/> (accessed Jun. 12, 2022).
164. S. A. Susin, H. K. Lorenzo, N. Zamzami, *et al.*, "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor," *Nature*, vol. 397, no. 6718, pp. 441–446, Feb. 1999, doi: 10.1038/17135.
 165. N. Joza, S. A. Susin, E. Daugas, *et al.*, "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death," *Nature*, vol. 410, no. 6828, pp. 549–554, Mar. 2001, doi: 10.1038/35069004.
 166. N. N. Danial and S. J. Korsmeyer, "Cell death: critical control points," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 205–219, Jan. 2004, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00046-7.
 167. Y. Tsujimoto, L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Nowell, and C. M. Croce, "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation," *Science*, vol. 226, no. 4678, pp. 1097–1099, 1984, doi: 10.1126/SCIENCE.6093263.
 168. "Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9408956/> (accessed Jun. 12, 2022).
 169. G. Kroemer, L. Galluzzi, and C. Brenner, "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death," *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 1, pp. 99–163, Jan. 2007, doi: 10.1152/PHYSREV.00013.2006.
 170. E. C. LaCasse, D. J. Mahoney, H. H. Cheung, *et al.*, "IAP-targeted therapies for cancer," *Oncogene*, vol. 27, no. 48, pp. 6252–6275, Oct. 2008, doi: 10.1038/ONC.2008.302.
 171. I. M. Ghobrial, T. E. Witzig, and A. A. Adjei, "Targeting apoptosis pathways in cancer therapy," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 55, no. 3, pp. 178–194, May 2005, doi: 10.3322/CANJCLIN.55.3.178.
 172. C. B. Thompson, "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease," *Science*, vol. 267, no. 5203, pp. 1456–1462, 1995, doi: 10.1126/SCIENCE.7878464.
 173. L. Eckhart, C. Ballaun, A. Uthman, *et al.*, "Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 42, pp. 35077–35080, Oct. 2005, doi: 10.1074/JBC.C500282200.
 174. "The prognostic significance of Caspase-3 and survivin expression in colorectal cancer patients - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33277831/> (accessed Apr. 24, 2022).
 175. H. Ozawa, R. W. Keane, A. E. Marcillo, P. H. Diaz, and W. D. Dietrich, "Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats," *Exp. Neurol.*, vol. 177, no. 1, pp. 306–313, 2002, doi: 10.1006/EXNR.2002.7998.
 176. M. O. Hengartner, "The biochemistry of apoptosis," *Nature*, vol. 407, no. 6805, pp. 770–776, Oct. 2000, doi: 10.1038/35037710.
 177. K. K. W. Wang, "Calpain and caspase: can you tell the difference?, by Kevin K.W. Wang Vol. 23, pp. 20-26," *Trends Neurosci.*, vol. 23, no. 2, p. 59, 2000, doi: 10.1016/S0166-2236(99)01536-2.
 178. H. Li, F. Colbourne, P. Sun, Z. Zhao, and A. M. Buchan, "Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral

- ischemia in rats,” *Stroke*, vol. 31, no. 1, pp. 176–182, 2000, doi: 10.1161/01.STR.31.1.176.
179. K. C. Chou, A. G. Tomasselli, and R. L. Heinrikson, “Prediction of the tertiary structure of a caspase-9/inhibitor complex,” *FEBS Lett.*, vol. 470, no. 3, pp. 249–256, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01333-8.
 180. Y. Wang, S. Hu, M. Tuerdi, *et al.*, “Initiator and executioner caspases in salivary gland apoptosis of *Rhipicephalus haemaphysaloides*,” *Parasit. Vectors*, vol. 13, no. 1, Jun. 2020, doi: 10.1186/S13071-020-04164-5.
 181. S. McComb, P. K. Chan, A. Guinot, *et al.*, “Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7,” *Sci. Adv.*, vol. 5, no. 7, pp. 9433–9464, Jul. 2019, doi: 10.1126/SCIADV.AAU9433.
 182. D. Tang, M. T. Lotze, R. Kang, and H. J. Zeh, “Apoptosis promotes early tumorigenesis,” *Oncogene*, vol. 30, no. 16, pp. 1851–1854, Apr. 2011, doi: 10.1038/ONC.2010.573.
 183. I. N. Lavrik, “Systems biology of apoptosis signaling networks,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 21, no. 4, pp. 551–555, Aug. 2010, doi: 10.1016/J.COPBIO.2010.07.001.
 184. H. Yuanming, M. A. Benedict, L. Ding, and G. Núñez, “Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis,” *EMBO J.*, vol. 18, no. 13, pp. 3586–3595, Jul. 1999, doi: 10.1093/EMBOJ/18.13.3586.
 185. K. J. Kelly, R. M. Sandoval, K. W. Dunn, B. A. Molitoris, and P. C. Dagher, “A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis,” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 284, no. 5, May 2003, doi: 10.1152/AJPCELL.00353.2002.
 186. F. Bao and D. Liu, “Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptotic cell death and activates caspase-3,” *Neuroscience*, vol. 116, no. 1, pp. 59–70, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0306-4522(02)00571-7.
 187. M. Zhou, X. Liu, Z. Li, *et al.*, “Caspase-3 regulates the migration, invasion, and metastasis of colon cancer cells,” *Int. J. cancer*, vol. 143, no. 4, p. 921, Aug. 2018, doi: 10.1002/IJC.31374.
 188. K. M. Boatright and G. S. Salvesen, “Mechanisms of caspase activation,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 725–731, 2003, doi: 10.1016/J.CEB.2003.10.009.
 189. K. Suresh, K. Carino, L. Johnston, *et al.*, “A nonapoptotic endothelial barrier-protective role for caspase-3,” *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 316, no. 6, p. L1118, Jun. 2019, doi: 10.1152/AJPLUNG.00487.2018.
 190. J. Zachwieja, G. Dworacki, W. Bobkowski, *et al.*, “Increased apoptosis of peripheral blood lymphocytes in children with nephrotic syndrome,” *Pediatr. Nephrol.*, vol. 17, no. 3, pp. 197–200, 2002, doi: 10.1007/S00467-001-0782-1.
 191. H. Steller, “Mechanisms and genes of cellular suicide,” *Science*, vol. 267, no. 5203, pp. 1445–1449, 1995, doi: 10.1126/SCIENCE.7878463.

192. J. Savill, "Apoptosis and renal injury," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 4, no. 3, pp. 263–269, 1995, doi: 10.1097/00041552-199505000-00012.
193. G. H. Tesch, A. Schwarting, K. Kinoshita, *et al.*, "Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis," *J. Clin. Invest.*, vol. 103, no. 1, pp. 73–80, 1999, doi: 10.1172/JCI4876.
194. H. Soto, J. Mosquera, B. Rodríguez-Iturbe, C. Henriquez La Roche, and A. Pinto, "Apoptosis in proliferative glomerulonephritis: decreased apoptosis expression in lupus nephritis," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 12, no. 2, pp. 273–280, Feb. 1997, doi: 10.1093/NDT/12.2.273.
195. "The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen, antigen, and accelerant - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9952279/> (accessed Jun. 21, 2022).
196. I. K. Hewitt, A. K. House, J. M. Potter, and B. F. Kinnear, "Altered in vitro lymphocyte response in childhood nephrotic syndrome," *Pediatr. Nephrol.*, vol. 6, no. 5, pp. 464–466, Sep. 1992, doi: 10.1007/BF00874015.
197. "Suppressor T-lymphocyte dysfunction in MCNS: role of the H2 histamine receptor-bearing suppressor T lymphocytes - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2137404/> (accessed Jun. 24, 2022).
198. "T-cell subpopulations in childhood nephrotic syndrome - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8050203/> (accessed Jun. 24, 2022).
199. J. Stachowski, C. Barth, J. Michałkiewicz, *et al.*, "Th1/Th2 balance and CD45-positive T cell subsets in primary nephrotic syndrome," *Pediatr. Nephrol.*, vol. 14, no. 8–9, pp. 779–785, 2000, doi: 10.1007/PL00013437.
200. X. Tian, J. J. Kim, S. M. Monkley, *et al.*, "Podocyte-associated talin1 is critical for glomerular filtration barrier maintenance," *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 3, pp. 1098–1113, Mar. 2014, doi: 10.1172/JCI69778.
201. S. Ranganathan, "Pathology of Podocytopathies Causing Nephrotic Syndrome in Children," *Front. Pediatr.*, vol. 4, no. MAR, Mar. 2016, doi: 10.3389/FPED.2016.00032.
202. J. Reiser and M. M. Altintas, "Podocytes," *F1000Research*, vol. 5, 2016, doi: 10.12688/F1000RESEARCH.7255.1/DOI.
203. Y. Chen, Z. Wang, Q. Li, *et al.*, "CXCL16/ERK1/2 pathway regulates human podocytes growth, migration, apoptosis and epithelial mesenchymal transition," *Mol. Med. Rep.*, vol. 25, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.3892/MMR.2022.12728.
204. B. Liu, H. Zhang, X. Tan, *et al.*, "GSPE reduces lead-induced oxidative stress by activating the Nrf2 pathway and suppressing miR153 and GSK-3 β in rat kidney," *Oncotarget*, vol. 8, no. 26, pp. 42226–42237, 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.15033.
205. X. Zheng, S. Li, J. Li, *et al.*, "Hexavalent chromium induces renal apoptosis and autophagy via disordering the balance of mitochondrial dynamics in rats," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 204, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.ECOENV.2020.111061.
206. N. Lu and C. J. Malemud, "Extracellular Signal-Regulated Kinase: A

- Regulator of Cell Growth, Inflammation, Chondrocyte and Bone Cell Receptor-Mediated Gene Expression,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 15, Aug. 2019, doi: 10.3390/IJMS20153792.
207. F. Liu, X. Yang, M. Geng, and M. Huang, “Targeting ERK, an Achilles’ Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 8, no. 4, pp. 552–562, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.APSB.2018.01.008.
 208. T. G. Boulton, S. H. Nye, D. J. Robbins, *et al.*, “ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF,” *Cell*, vol. 65, no. 4, pp. 663–675, May 1991, doi: 10.1016/0092-8674(91)90098-J.
 209. A. P. Lakshmanan, R. A. Thandavarayan, K. Watanabe, *et al.*, “Modulation of AT-1R/MAPK cascade by an olmesartan treatment attenuates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 348, no. 1, pp. 104–111, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.MCE.2011.07.041.
 210. T. Wada, J. W. Pippin, C. B. Marshall, S. V. Griffin, and S. J. Shankland, “Dexamethasone Prevents Podocyte Apoptosis Induced by Puromycin Aminonucleoside: Role of p53 and Bcl-2–Related Family Proteins,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, no. 9, pp. 2615–2625, Sep. 2005, doi: 10.1681/ASN.2005020142.
 211. P. Mundel and S. J. Shankland, “Podocyte biology and response to injury,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 13, no. 12, pp. 3005–3015, Dec. 2002, doi: 10.1097/01.ASN.0000039661.06947.FD.
 212. B. Vogelstein, D. Lane, and A. J. Levine, “Surfing the p53 network,” *Nature*, vol. 408, no. 6810, pp. 307–310, 2000, doi: 10.1038/35042675.
 213. S. Cory, D. C. S. Huang, and J. M. Adams, “The Bcl-2 family: Roles in cell survival and oncogenesis,” *Oncogene*, vol. 22, no. 53, pp. 8590–8607, 2003, doi: 10.1038/SJ.ONC.1207102.
 214. G. Nuñez, M. A. Benedict, Y. Hu, and N. Inohara, “Caspases: the proteases of the apoptotic pathway,” *Oncogene*, vol. 17, no. 25, pp. 3237–3245, 1998, doi: 10.1038/SJ.ONC.1202581.
 215. S. Bates and K. H. Vousden, “Mechanisms of p53-mediated apoptosis,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 55, no. 1, pp. 28–37, 1999, doi: 10.1007/S000180050267.
 216. K. M. Ryan, A. C. Phillips, and K. H. Vousden, “Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 332–337, Jun. 2001, doi: 10.1016/S0955-0674(00)00216-7.
 217. A. J. Minn, P. Vélez, S. L. Schendel, *et al.*, “Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes,” *Nature*, vol. 385, no. 6614, pp. 353–356, Jan. 1997, doi: 10.1038/385353A0.
 218. J. M. Adams and S. Cory, “Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 19, no. 5, pp. 488–496, Oct. 2007, doi: 10.1016/J.COI.2007.05.004.
 219. A. J. Levine, J. Momand, and C. A. Finlay, “The p53 tumour suppressor gene,” *Nature*, vol. 351, no. 6326, pp. 453–456, 1991, doi: 10.1038/351453A0.
 220. M. Oren and V. Rotter, “Introduction: p53--the first twenty years,” *Cell*.

- Mol. Life Sci.*, vol. 55, no. 1, pp. 9–11, 1999, doi: 10.1007/S000180050265.
221. D. P. Lane, "Cancer. p53, guardian of the genome," *Nature*, vol. 358, no. 6381, pp. 15–16, 1992, doi: 10.1038/358015A0.
 222. R. A. Lockshin and Z. Zakeri, "Apoptosis, autophagy, and more," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, no. 12, pp. 2405–2419, Dec. 2004, doi: 10.1016/J.BIOCEL.2004.04.011.
 223. C. H. A. Cheung, Y. C. Chang, T. Y. Lin, S. M. Cheng, and E. Leung, "Anti-apoptotic proteins in the autophagic world: an update on functions of XIAP, Survivin, and BRUCE," *J. Biomed. Sci.*, vol. 27, no. 1, Feb. 2020, doi: 10.1186/S12929-020-0627-5.
 224. S. Cory and J. M. Adams, "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 9, pp. 647–656, Sep. 2002, doi: 10.1038/NRC883.
 225. N. Shahar and S. Larisch, "Inhibiting the inhibitors: Targeting anti-apoptotic proteins in cancer and therapy resistance," *Drug Resist. Updat.*, vol. 52, p. 100712, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.DRUP.2020.100712.
 226. Å. B. Gustafsson and R. A. Gottlieb, "Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 292, no. 1, Jan. 2007, doi: 10.1152/AJPCCELL.00229.2006.
 227. D. A. Carson and J. M. Ribeiro, "Apoptosis and disease," *Lancet (London, England)*, vol. 341, no. 8855, pp. 1251–1254, May 1993, doi: 10.1016/0140-6736(93)91154-E.
 228. S. Maji, S. Panda, S. Samal, *et al.*, "Bcl-2 antiapoptotic family proteins and chemoresistance in cancer," *Elsevier*, Accessed: May 31, 2022. Available: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065230X17300490?casa_token=eGb2SvPWKWwAAAAA:KespH0vbLmqXvDoKW8VG8zlFluHU6qdB7QsNA8uOB_gtcSYxmnlxbsmFLWdfOMabW_IrKC7CqQ
 229. J. T. Opferman and A. Kothari, "Anti-apoptotic BCL-2 family members in development," *Cell Death Differ.*, vol. 25, no. 1, pp. 37–45, 2018, doi: 10.1038/CDD.2017.170.
 230. V. Suvarna, V. Singh, and M. Murahari, "Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 862, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2019.172655.
 231. D. Stehle, M. Grimm, S. Einsele-Scholz, F. L.-S. reports, and undefined 2018, "Contribution of BH3-domain and transmembrane-domain to the activity and interaction of the pore-forming Bcl-2 proteins Bok, Bak, and Bax," *nature.com*, Accessed: May 31, 2022. Available: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-30603-6>
 232. K. J. Campbell and S. W. G. Tait, "Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer," *Open Biol.*, vol. 8, no. 5, 2018, doi: 10.1098/RSOB.180002.
 233. J. Kale, E. J. Osterlund, and D. W. Andrews, "BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death," *Cell Death Differ.*, vol. 25, no. 1, pp. 65–80, 2018, doi: 10.1038/CDD.2017.186.

234. F. Edlich, "The great migration of Bax and Bak," *Mol. Cell. Oncol.*, vol. 2, no. 3, Jul. 2015, doi: 10.4161/23723556.2014.995029.
235. S. Maji, S. Panda, S. K. Samal, *et al.*, "Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer," *Adv. Cancer Res.*, vol. 137, pp. 37–75, Jan. 2018, doi: 10.1016/BS.ACR.2017.11.001.
236. D. Vucic and W. J. Fairbrother, "The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 20, pp. 5995–6000, Oct. 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0729.
237. H. Shin, M. Renatus, B. P. Eckelman, *et al.*, "The BIR domain of IAP-like protein 2 is conformationally unstable: implications for caspase inhibition," *Biochem. J.*, vol. 385, no. Pt 1, pp. 1–10, Jan. 2005, doi: 10.1042/BJ20041107.
238. Y. Wei, T. Fan, and M. Yu, "Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 40, no. 4, pp. 278–288, Apr. 2008, doi: 10.1111/J.1745-7270.2008.00407.X.
239. M. S. Mohamed, M. K. Bishr, F. M. Almutairi, and A. G. Ali, "Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer," *Apoptosis*, vol. 22, no. 12, pp. 1487–1509, Dec. 2017, doi: 10.1007/S10495-017-1429-4.
240. L. Dubrez, J. Berthelet, and V. Glorian, "IAP proteins as targets for drug development in oncology," *Onco. Targets. Ther.*, vol. 9, pp. 1285–1304, Sep. 2013, doi: 10.2147/OTT.S33375.
241. X. Cheng, L. Zhang, K. Zhang, *et al.*, "Extended report: Circular RNA VMA21 protects against intervertebral disc degeneration through targeting miR-200c and X linked inhibitor-of-apoptosis protein," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 77, no. 5, p. 770, May 2018, doi: 10.1136/ANNRHEUMDIS-2017-212056.
242. H. Tu and M. Costa, "XIAP's Profile in Human Cancer," *Biomolecules*, vol. 10, no. 11, pp. 1–15, Nov. 2020, doi: 10.3390/BIOM10111493.
243. B. P. Eckelman and G. S. Salvesen, "The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 6, pp. 3254–3260, Feb. 2006, doi: 10.1074/JBC.M510863200.
244. B. Bornstein, Y. Gottfried, N. Edison, *et al.*, "ARTS binds to a distinct domain in XIAP-BIR3 and promotes apoptosis by a mechanism that is different from other IAP-antagonists," *Apoptosis*, vol. 16, no. 9, pp. 869–881, Sep. 2011, doi: 10.1007/S10495-011-0622-0.
245. L. Vasilikos, L. M. Spilgies, J. Knop, and W. W. L. Wong, "Regulating the balance between necroptosis, apoptosis and inflammation by inhibitors of apoptosis proteins," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 95, no. 2, pp. 160–165, Feb. 2017, doi: 10.1038/ICB.2016.118.
246. S. Wicki, U. Gurzeler, W. W. L. Wong, *et al.*, "Loss of XIAP facilitates switch to TNF α -induced necroptosis in mouse neutrophils," *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 10, 2016, doi: 10.1038/CDDIS.2016.311.
247. A. C. A. Mudde, C. Booth, and R. A. Marsh, "Evolution of Our Understanding of XIAP Deficiency," *Front. Pediatr.*, vol. 9, p. 557, Jun. 2021, doi: 10.3389/FPED.2021.660520/BIBTEX.
248. M. Dziadzio, S. Ammann, C. Canning, *et al.*, "Symptomatic males and female carriers in a large Caucasian kindred with XIAP deficiency," *J.*

- Clin. Immunol.*, vol. 35, no. 5, pp. 439–444, Jul. 2015, doi: 10.1007/S10875-015-0166-0.
249. R. B. Damgaard, U. Nachbur, M. Yabal, *et al.*, “The ubiquitin ligase XIAP recruits LUBAC for NOD2 signaling in inflammation and innate immunity,” *Mol. Cell*, vol. 46, no. 6, pp. 746–758, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2012.04.014.
 250. B. P. Eckelman, G. S. Salvesen, and F. L. Scott, “Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family,” *EMBO Rep.*, vol. 7, no. 10, pp. 988–994, Oct. 2006, doi: 10.1038/SJ.EMBOR.7400795.
 251. M. Gyrð-Hansen, M. Darding, M. Miasari, *et al.*, “IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF- κ B as well as cell survival and oncogenesis,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 11, pp. 1309–1317, 2008, doi: 10.1038/NCB1789.
 252. F. L. Scott, J. B. Denault, S. J. Riedl, *et al.*, “XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs,” *EMBO J.*, vol. 24, no. 3, pp. 645–655, Feb. 2005, doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7600544.
 253. W. C. Hsieh, Y. T. Chuang, I. H. Chiang, *et al.*, “Inability to resolve specific infection generates innate immunodeficiency syndrome in *Xiap*^{-/-} mice,” *Blood*, vol. 124, no. 18, pp. 2847–2857, Oct. 2014, doi: 10.1182/BLOOD-2014-03-564609.
 254. M. Lu, S. C. Lin, Y. Huang, *et al.*, “XIAP induces NF- κ B activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization,” *Mol. Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 689–702, Jun. 2007, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2007.05.006.
 255. R. B. Damgaard, B. K. Fiil, C. Speckmann, *et al.*, “Disease-causing mutations in the XIAP BIR2 domain impair NOD2-dependent immune signalling,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, no. 8, pp. 1278–1295, Aug. 2013, doi: 10.1002/EMMM.201303090.
 256. M. Gyrð-Hansen, M. Darding, M. Miasari, *et al.*, “IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF- κ B as well as cell survival and oncogenesis,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 11, pp. 1309–1317, 2008, doi: 10.1038/NCB1789.
 257. B. A. Wevers, T. B. Geijtenbeek, and S. I. Gringhuis, “C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity,” *Future Microbiol.*, vol. 8, no. 7, pp. 839–854, Jul. 2013, doi: 10.2217/FMB.13.56.
 258. K. E. Lawlor, N. Khan, A. Mildenhall, *et al.*, “RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL,” *Nat. Commun.*, vol. 6, Feb. 2015, doi: 10.1038/NCOMMS7282.
 259. J. Knop, L. M. Spilgies, S. Rufli, *et al.*, “Correction: TNFR2 induced priming of the inflammasome leads to a RIPK1-dependent cell death in the absence of XIAP,” *Cell Death Dis.*, vol. 11, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1038/S41419-020-2261-2.
 260. K. E. Lawlor, R. Feltham, M. Yabal, *et al.*, “XIAP Loss Triggers RIPK3- and Caspase-8-Driven IL-1 β Activation and Cell Death as a Consequence of TLR-MyD88-Induced cIAP1-TRAF2 Degradation,” *Cell Rep.*, vol. 20, no. 3, pp. 668–682, Jul. 2017, doi:

- 10.1016/J.CELREP.2017.06.073.
261. R. Levy, L. Gérard, J. Kuemmerle-Deschner, *et al.*, "Phenotypic and genotypic characteristics of cryopyrin-associated periodic syndrome: a series of 136 patients from the Eurofever Registry," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 74, no. 11, pp. 2043–2049, Nov. 2015, doi: 10.1136/ANNRHEUMDIS-2013-204991.
 262. T. Schwerd, S. Pandey, H. T. Yang, *et al.*, "Impaired antibacterial autophagy links granulomatous intestinal inflammation in Niemann-Pick disease type C1 and XIAP deficiency with NOD2 variants in Crohn's disease," *Gut*, vol. 66, no. 6, pp. 1060–1073, Jun. 2017, doi: 10.1136/GUTJNL-2015-310382.
 263. S. Gradzka, O. S. Thomas, O. Kretz, *et al.*, "Inhibitor of apoptosis proteins are required for effective fusion of autophagosomes with lysosomes," *Cell Death Dis.*, vol. 9, no. 5, May 2018, doi: 10.1038/S41419-018-0508-Y.
 264. C. Chen, T. S. Liu, S. C. Zhao, *et al.*, "XIAP impairs mitochondrial function during apoptosis by regulating the Bcl-2 family in renal cell carcinoma," *Exp. Ther. Med.*, vol. 15, no. 5, p. 4587, May 2018, doi: 10.3892/ETM.2018.5974.
 265. W. T. Huang, Y. H. Tsai, S. H. Chen, *et al.*, "HDAC2 and HDAC5 Up-Regulations Modulate Survivin and miR-125a-5p Expressions and Promote Hormone Therapy Resistance in Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Cells," *Front. Pharmacol.*, vol. 8, no. DEC, Dec. 2017, doi: 10.3389/FPHAR.2017.00902.
 266. R. Li, B. L. Chen, Y. W. Zhou, *et al.*, "Expression and clinical significance of Apollon in esophageal squamous cell carcinoma," *Mol. Med. Rep.*, vol. 14, no. 3, pp. 1933–1940, Sep. 2016, doi: 10.3892/MMR.2016.5473.
 267. Y. G. Assaraf, A. Brozovic, A. C. Gonçalves, *et al.*, "The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer," *Drug Resist. Updat.*, vol. 46, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.DRUP.2019.100645.
 268. X. Gao, L. Zhang, Y. Wei, *et al.*, "Prognostic Value of XIAP Level in Patients with Various Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis," *J. Cancer*, vol. 10, no. 6, pp. 1528–1537, 2019, doi: 10.7150/JCA.28229.
 269. F. Li, I. A. M. Aljahdali, R. Zhang, *et al.*, "Kidney cancer biomarkers and targets for therapeutics: survivin (BIRC5), XIAP, MCL-1, HIF1 α , HIF2 α , NRF2, MDM2, MDM4, p53, KRAS and AKT in renal cell carcinoma," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 40, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S13046-021-02026-1.
 270. J. Liu, Y. Cui, S. Yu, *et al.*, "Survivin expression and localization in different organs of yaks (*Bos grunniens*)," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 268, pp. 80–87, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.YGCEN.2018.07.020.
 271. D. Chen, J. Xu, and Q. Zhang, "Detection of survivin expression in bladder cancer and renal cell carcinoma using specific monoclonal antibodies," *Oncol. Rep.*, vol. 39, no. 6, pp. 2817–2828, Jun. 2018, doi: 10.3892/OR.2018.6359/HTML.
 272. P. Y. Lin, C. T. Tsai, W. L. Chuang, *et al.*, "Chlorella sorokiniana

- induces mitochondrial-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells and inhibits xenograft tumor growth in vivo,” *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 17, no. 1, Feb. 2017, doi: 10.1186/S12906-017-1611-9.
273. X. Bai, Y. Zhang, H. Jiang, *et al.*, “Effects of maslinic acid on the proliferation and apoptosis of A549 lung cancer cells,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 13, no. 1, pp. 117–122, Jan. 2016, doi: 10.3892/MMR.2015.4552.
 274. C. Park, S. H. Hong, and Y. H. Choi, “Induction of apoptosis by Dae-Hwang-Mok-Dan-Tang in HCT-116 colon cancer cells through activation of caspases and inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling,” *Integr. Med. Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 179–189, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.IMR.2017.03.003.
 275. D. C. Altieri, “Validating survivin as a cancer therapeutic target,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 1, pp. 46–54, Jan. 2003, doi: 10.1038/NRC968.
 276. G. Ambrosini, C. Adida, and D. C. Altieri, “A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma,” *Nat. Med.*, vol. 3, no. 8, pp. 917–921, Aug. 1997, doi: 10.1038/NM0897-917.
 277. S. W. Muchmore, J. Chen, C. Jakob, *et al.*, “Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin,” *Mol. Cell*, vol. 6, no. 1, pp. 173–182, 2000, doi: 10.1016/S1097-2765(05)00019-5.
 278. M. S. Coumar, F. Y. Tsai, J. R. Kanwar, S. Sarvagalla, and C. H. A. Cheung, “Treat cancers by targeting survivin: just a dream or future reality?,” *Cancer Treat. Rev.*, vol. 39, no. 7, pp. 802–811, Nov. 2013, doi: 10.1016/J.CTRV.2013.02.002.
 279. A. Vazquez, E. E. Bond, A. J. Levine, and G. L. Bond, “The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 12, pp. 979–987, 2008, doi: 10.1038/NRD2656.
 280. M. Mobahat, A. Narendran, and K. Riabowol, “Survivin as a preferential target for cancer therapy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 2, pp. 2494–2516, Feb. 2014, doi: 10.3390/IJMS15022494.
 281. K. Hofmann, P. Bucher, and J. Tschopp, “The CARD domain: a new apoptotic signalling motif,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 22, no. 5, pp. 155–156, 1997, doi: 10.1016/S0968-0004(97)01043-8.
 282. G. S. Salvesen and C. S. Duckett, “IAP proteins: blocking the road to death’s door,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 6, pp. 401–410, 2002, doi: 10.1038/NRM830.
 283. D. C. Altieri, “Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer,” *Oncogene*, vol. 22, no. 53, pp. 8581–8589, Nov. 2003, doi: 10.1038/SJ.ONC.1207113.
 284. H. Marusawa, S. ichi Matsuzawa, K. Welsh, *et al.*, “HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression,” *EMBO J.*, vol. 22, no. 11, pp. 2729–2740, Jun. 2003, doi: 10.1093/EMBOJ/CDG263.
 285. A. C. Mita, M. M. Mita, S. T. Nawrocki, and F. J. Giles, “Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 16, pp. 5000–5005, Aug. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0746.

286. L. Li, Y. Gao, L. Zhang, *et al.*, "Silibinin inhibits cell growth and induces apoptosis by caspase activation, down-regulating survivin and blocking EGFR-ERK activation in renal cell carcinoma," *Cancer Lett.*, vol. 272, no. 1, pp. 61–69, Dec. 2008, doi: 10.1016/J.CANLET.2008.06.033.
287. R. Honda, R. Körner, and E. A. Nigg, "Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis," *Mol. Biol. Cell*, 14,8, 3325–3341, Aug. 2003, doi: 10.1091/MBE.E02-11-0769.
288. R. Gassmann, A. Carvalho, A. J. Henzing, *et al.*, "Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle," *J. Cell Biol.*, 166, 2, 179–191, Jul. 2004, doi: 10.1083/JCB.200404001.
289. M. A. Bolton, W. Lan, S. E. Powers, *et al.*, "Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation," *Mol. Biol. Cell*, 13, 9, 3064–3077, Sep. 2002, doi: 10.1091/MBE.E02-02-0092.
290. D. S. O'Connor, D. Grossman, J. Plescia, *et al.*, "Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 24, 13103–13107, Nov. 2000, doi: 10.1073/PNAS.240390697.
291. Q. P. Vong, K. Cao, H. Y. Li, P. A. Iglesias, and Y. Zheng, "Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin," *Science*, vol. 310, no. 5753, pp. 1499–1504, Dec. 2005, doi: 10.1126/SCIENCE.1120160.
292. F. Li, G. Ambrosini, E. Y. Chu, *et al.*, "Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin," *Nature*, 396, 6711, 580–584, Dec. 1998, doi: 10.1038/25141.
293. M. Ikeguchi, T. Ueda, T. Sakatani, Y. Hirooka, and N. Kaibara, "Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma," *Diagn. Mol. Pathol.*, vol. 11, no. 1, pp. 33–40, 2002, doi: 10.1097/00019606-200203000-00007.
294. T. K. Niu, Y. Cheng, X. Ren, and J. M. Yang, "Interaction of Beclin 1 with survivin regulates sensitivity of human glioma cells to TRAIL-induced apoptosis," *FEBS Lett.*, vol. 584, 16, 3519–3524, Aug. 2010, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2010.07.018.
295. H. Roca, Z. Varsos, and K. J. Pienta, "CCL2 protects prostate cancer PC3 cells from autophagic death via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent survivin up-regulation," *J. Biol. Chem.*, 283, 36, 25057–25073, Sep. 2008, doi: 10.1074/JBC.M801073200.
296. G. Jiang, B. Ren, L. Xu, *et al.*, "Survivin may enhance DNA double-strand break repair capability by up-regulating Ku70 in human KB cells," *Anticancer Res.*, 29, 1, 223–228, Jan. 2009, Accessed: Jun. 21, 2022. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19331153/>
297. G. Capalbo, K. Dittmann, C. Weiss, *et al.*, "Radiation-induced survivin nuclear accumulation is linked to DNA damage repair," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 77,1, 226–234, May 2010, doi: 10.1016/J.IJROBP.2009.12.001.
298. S. Reichert, C. Rödel, J. Mirsch, *et al.*, "Survivin inhibition and DNA

- double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma,” *Radiother. Oncol.*, 101, 1, 51–58, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.RADONC.2011.06.037.
299. G. Ambrosini, C. Adida, and D. C. Altieri, “A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma,” *Nat. Med.*, 3, 8, 917–921, Aug. 1997, doi: 10.1038/NM0897-917.
 300. S. Fukuda and L. M. Pelus, “Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues,” *Mol. Cancer Ther.*, 5, 5, 1087–1098, May 2006, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0375.
 301. M. Deguchi, K. Shiraki, H. Inoue, *et al.*, “Expression of survivin during liver regeneration,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 297, 1, 59–64, 2002, doi: 10.1016/S0006-291X(02)02128-9.
 302. E. A. Johnson, S. I. Svetlov, K. K. W. Wang, R. L. Hayes, and J. A. Pineda, “Cell-specific DNA fragmentation may be attenuated by a survivin-dependent mechanism after traumatic brain injury in rats,” *Exp. brain Res.*, vol. 167, no. 1, pp. 17–26, Nov. 2005, doi: 10.1007/S00221-005-2362-2.
 303. M. J. Duffy, N. O'Donovan, D. J. Brennan, W. M. Gallagher, and B. M. Ryan, “Survivin: a promising tumor biomarker,” *Cancer Lett.*, vol. 249, no. 1, pp. 49–60, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.CANLET.2006.12.020.
 304. D. C. Altieri, “The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy,” *Trends Mol. Med.*, vol. 7, no. 12, pp. 542–547, 2001, doi: 10.1016/S1471-4914(01)02243-2.
 305. A. Mirza, M. McGuirk, T. N. Hockenberry, *et al.*, “Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway,” *Oncogene*, 21, 17, 2613–2622, Apr. 2002, doi: 10.1038/SJ.ONC.1205353.
 306. D. J. Den Hartogh and E. Tsiani, “Health Benefits of Resveratrol in Kidney Disease: Evidence from In Vitro and In Vivo Studies,” *Nutrients*, 11, 7, Jul. 2019, doi: 10.3390/NU11071624.
 307. C. Chu, F. J. Lu, R. H. Yeh, Z. L. Li, and C. H. Chen, “Synergistic antioxidant activity of resveratrol with genistein in high-glucose treated Madin-Darby canine kidney epithelial cells,” *Biomed. Reports*, 4, 3, 349, Mar. 2016, doi: 10.3892/BR.2016.573.
 308. U. Stervbo, O. Vang, and C. Bonnesen, “A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine,” *Food Chem.*, 101, 2, 449–457, Jan. 2007, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2006.01.047.
 309. Q. H. Du, C. Peng, and H. Zhang, “Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics,” *Pharm. Biol.*, 51, 11, 1347–1354, Nov. 2013, doi: 10.3109/13880209.2013.792849.
 310. J. Jin, Y. Li, X. Zhang, *et al.*, “Evaluation of Both Free Radical Scavenging Capacity and Antioxidative Damage Effect of Polydatin,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, 923, 57–62, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-38810-6_8.
 311. H. L. Wang, J. P. Gao, Y. L. Han, *et al.*, “Comparative studies of polydatin and resveratrol on mutual transformation and antioxidative effect in vivo,” *Phytomedicine*, 22, 5, 553–559, May 2015, doi:

- 10.1016/J.PHYMED.2015.03.014.
312. M. Zhang, Z. Zhao, M. Shen, *et al.*, "Polydatin protects cardiomyocytes against myocardial infarction injury by activating Sirt3," *Biochim. Biophys. acta. Mol. basis Dis.*, 1863, 8, 1962–1972, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.BBADIS.2016.09.003.
 313. Q. hong Meng, H. bao Liu, and J. bo Wang, "Polydatin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury by decreasing apoptosis and oxidative stress through activating sonic hedgehog signaling pathway," *Food Chem. Toxicol.*, 96, 215–225, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.FCT.2016.07.032.
 314. Z. Q. Chen, Q. S. Wei, G. J. Hong, *et al.*, "Polydatin induces bone marrow stromal cells migration by activation of ERK1/2," *Biomed. Pharmacother.*, 82, 49–53, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2016.04.059.
 315. Q. L. Zhou, R. Z. Qin, Y. X. Yang, K. B. Huang, and X. W. Yang, "Polydatin possesses notable anti-osteoporotic activity via regulation of OPG, RANKL and β -catenin," *Mol. Med. Rep.*, 14, 2, 1865–1869, Aug. 2016, doi: 10.3892/MMR.2016.5432.
 316. Y. Uchida, H. Yamazaki, S. Watanabe, *et al.*, "Enhancement of NF-kappaB activity by resveratrol in cytokine-exposed mesangial cells," *Clin. Exp. Immunol.*, 142, 1, 76–83, Oct. 2005, doi: 10.1111/J.1365-2249.2005.02895.X.
 317. F. Chen, V. Castranova, and X. Shi, "New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation," *Am. J. Pathol.*, 159, 2, 387–397, 2001, doi: 10.1016/S0002-9440(10)61708-7.
 318. Y. Qiao, K. Gao, Y. Wang, X. Wang, and B. O. Cui, "Resveratrol ameliorates diabetic nephropathy in rats through negative regulation of the p38 MAPK/TGF- β 1 pathway," *Exp. Ther. Med.*, 13, 6, 3223–3230, Jun. 2017, doi: 10.3892/ETM.2017.4420.
 319. Y. Hui, M. Lu, Y. Han, *et al.*, "Resveratrol improves mitochondrial function in the remnant kidney from 5/6 nephrectomized rats," *Acta Histochem.*, 119, 4, 392–399, May 2017, doi: 10.1016/J.ACTHIS.2017.04.002.
 320. B. Fu, J. Zhao, W. Peng, H. Wu, and Y. Zhang, "Resveratrol rescues cadmium-induced mitochondrial injury by enhancing transcriptional regulation of PGC-1 α and SOD2 via the Sirt3/FoxO3a pathway in TCMK-1 cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 486, 1, 198–204, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.BBRC.2017.03.027.
 321. S. Liu, M. Zhao, Y. Zhou, *et al.*, "Resveratrol exerts dose-dependent anti-fibrotic or pro-fibrotic effects in kidneys: A potential risk to individuals with impaired kidney function," *Phytomedicine*, 57, 223–235, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.PHYMED.2018.12.024.
 322. H. Pavenstädt, "Roles of the podocyte in glomerular function," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 278, 2, 2000, doi: 10.1152/AJPRENAL.2000.278.2.F173.
 323. "[Study of resveratrol suppressing TGF-beta1 induced transdifferentiation of podocytes] - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24517069/> (accessed Jul. 01, 2022).

324. T. Zhang, Y. Chi, Y. Kang, *et al.*, "Resveratrol ameliorates podocyte damage in diabetic mice via SIRT1/PGC-1 α mediated attenuation of mitochondrial oxidative stress," *J. Cell. Physiol.*, 234, 4, 5033–5043, Apr. 2019, doi: 10.1002/JCP.27306.
325. C. Kim, S. H. Baek, J. Y. Um, B. S. Shim, and K. S. Ahn, "Resveratrol attenuates constitutive STAT3 and STAT5 activation through induction of PTP ϵ and SHP-2 tyrosine phosphatases and potentiates sorafenib-induced apoptosis in renal cell carcinoma," *BMC Nephrol.*, 17, 1, Feb. 2016, doi: 10.1186/S12882-016-0233-7.
326. J. K. Bhatt, S. Thomas, and M. J. Nanjan, "Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus," *Nutr. Res.*, vol. 32, 7, 537–541, Jul. 2012, doi: 10.1016/J.NUTRES.2012.06.003.
327. P. Brasnyó, G. A. Molnár, M. Mohás, *et al.*, "Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients," *Br. J. Nutr.*, 106, 3, 383–389, Aug. 2011, doi: 10.1017/S0007114511000316.
328. Z. Lv and Y. Guo, "Metformin and Its Benefits for Various Diseases," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 11, 191, Apr. 2020, doi: 10.3389/FENDO.2020.00191.
329. S. Gandini, M. Puntoni, B. M. Heckman-Stoddard, *et al.*, "Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders," *Cancer Prev. Res. (Phila)*, 7, 9, 867–885, Sep. 2014, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0424.
330. D. R. Morales and A. D. Morris, "Metformin in cancer treatment and prevention," *Annu. Rev. Med.*, 66, 17–29, Jan. 2015, doi: 10.1146/ANNUREV-MED-062613-093128.
331. C. Lamanna, M. Monami, N. Marchionni, and E. Mannucci, "Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials," *Diabetes. Obes. Metab.*, 13, 3, 221–228, 2011, doi: 10.1111/J.1463-1326.2010.01349.X.
332. A. Bhat, G. Sebastiani, and M. Bhat, "Systematic review: Preventive and therapeutic applications of metformin in liver disease," *World J. Hepatol.*, 7, 12, 1652, 2015, doi: 10.4254/WJH.V7.I12.1652.
333. C. Patrone, O. Eriksson, and D. Lindholm, "Diabetes drugs and neurological disorders: New views and therapeutic possibilities," *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2, 3, 256–262, 2014, doi: 10.1016/S2213-8587(13)70125-6.
334. E. Neven, B. Vervaet, K. Brand, *et al.*, "Metformin prevents the development of severe chronic kidney disease and its associated mineral and bone disorder," *Kidney Int.*, 94, 1, 102–113, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.KINT.2018.01.027.
335. A. I. Morales, D. Dettaille, M. Prieto, *et al.*, "Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway," *Kidney Int.*, 77, 10, 861–869, May 2010, doi: 10.1038/KI.2010.11.
336. J. Satriano, K. Sharma, R. C. Blantz, and A. Deng, "Induction of AMPK

- activity corrects early pathophysiological alterations in the subtotal nephrectomy model of chronic kidney disease,” *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 305, 5, Sep. 2013, doi: 10.1152/AJPRENAL.00293.2013.
337. J. R. Thériault, H. J. Palmer, and D. D. Pittman, “Inhibition of the Unfolded Protein Response by metformin in renal proximal tubular epithelial cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 409, 3, 500–505, Jun. 2011, doi: 10.1016/J.BBRC.2011.05.034.
 338. Y. S. Lee, Y. S. Kim, S. Y. Lee, *et al.*, “AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts,” *Bone*, 47, 5, 926–937, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.BONE.2010.08.001.
 339. E. K. Lee, J. U. Jeong, J. W. Chang, *et al.*, “Activation of AMP-activated protein kinase inhibits albumin-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis through inhibition of reactive oxygen species,” *Nephron. Exp. Nephrol.*, 121, 1–2, Dec. 2012, doi: 10.1159/000342802.
 340. H. ying Fan, X. kai Wang, X. Li, *et al.*, “Curcumin, as a pleiotropic agent, improves doxorubicin-induced nephrotic syndrome in rats,” *J. Ethnopharmacol.*, 250, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.JEP.2019.112502.
 341. J. B. Wu, S. F. Ye, C. L. Liang, *et al.*, “Qi-Dan Fang ameliorates adriamycin-induced nephrotic syndrome rat model by enhancing renal function and inhibiting podocyte injury,” *J. Ethnopharmacol.*, 151, 3, 1124–1132, Feb. 2014, doi: 10.1016/J.JEP.2013.12.028.
 342. A. Pedrycz, M. Wieczorski, and K. Czerny, “Glomerulosclerosis 4 weeks after administration of adriamycin in a single dose,” *Ann. Univ. Mariae Curie. Skłodowska. Med.*, 59, 1, 214–219, 2004, Accessed: Apr. 20, 2022. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16145983/>
 343. V. Quagliariello, M. De Laurentiis, D. Rea, *et al.*, “The SGLT-2 inhibitor empagliflozin improves myocardial strain, reduces cardiac fibrosis and pro-inflammatory cytokines in non-diabetic mice treated with doxorubicin,” *Cardiovasc. Diabetol.*, 20, 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12933-021-01346-Y.
 344. W. Wang, A. Tzanidis, M. Divjak, N. M. Thomson, and A. N. Stein-Oakley, “Altered signaling and regulatory mechanisms of apoptosis in focal and segmental glomerulosclerosis,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 12, no. 7, pp. 1422–1433, 2001, doi: 10.1681/ASN.V1271422.
 345. T. Niranjan, B. Bielez, A. Gruenwald, *et al.*, “The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease,” *Nat. Med.*, 14, 3, pp. 290–298, Mar. 2008, doi: 10.1038/NM1731.
 346. B. Xiao, L. N. Wang, W. Li, *et al.*, “Plasma microRNA panel is a novel biomarker for focal segmental glomerulosclerosis and associated with podocyte apoptosis,” *Cell Death Dis.*, 9, 5, May 2018, doi: 10.1038/S41419-018-0569-Y.
 347. Y. Li, X. Jiang, L. Song, M. Yang, and J. Pan, “Anti-apoptosis mechanism of triptolide based on network pharmacology in focal segmental glomerulosclerosis rats,” *Biosci. Rep.*, 40, 4, Apr. 2020, doi: 10.1042/BSR20192920.
 348. M. D. Sanchez-Niño, B. Fernandez, M. V. Perez-Gomez, *et al.*, “Albumin-induced apoptosis of tubular cells is modulated by BASP1,”

- Cell Death Dis.*, 6, 2, Jan. 2015, doi: 10.1038/CDDIS.2015.1.
349. Q. Zhuang, F. Li, J. Liu, *et al.*, "Nuclear exclusion of YAP exacerbates podocyte apoptosis and disease progression in Adriamycin-induced focal segmental glomerulosclerosis," *Lab. Invest.*, 101, 2, 258–270, Feb. 2021, doi: 10.1038/S41374-020-00503-3.
 350. S. M. Yang, K. F. Hua, Y. C. Lin, *et al.*, "Citral is renoprotective for focal segmental glomerulosclerosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis and activating Nrf2 pathway in mice," *PLoS One*, 8, 9, Sep. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0074871.
 351. G. Liu and L. He, "Epigallocatechin-3-Gallate Attenuates Adriamycin-Induced Focal Segmental Glomerulosclerosis via Suppression of Oxidant Stress and Apoptosis by Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1 α / Angiopoietin-Like 4 Pathway," *Pharmacology*, 103, 5–6, 303–314, Apr. 2019, doi: 10.1159/000496799.
 352. S. M. Yang, Y. L. Chan, K. F. Hua, *et al.*, "Osthole improves an accelerated focal segmental glomerulosclerosis model in the early stage by activating the Nrf2 antioxidant pathway and subsequently inhibiting NF- κ B-mediated COX-2 expression and apoptosis," *Free Radic. Biol. Med.*, 73, 260–269, 2014, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2014.05.009.
 353. I. Burlaka, I. Mityuryayeva, and I. Bagdasarova, "Clinical and Apoptotic Factors Defining and Predicting Steroid Resistance in Nephrotic Syndrome in Children," *Glob. Pediatr. Heal.*, vol. 9, Mar. 2022, doi: 10.1177/2333794X221085392.
 354. L. Galluzzi, S. A. Aaronson, J. Abrams, *et al.*, "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes," *Cell Death Differ.*, 16, 8, 1093–1107, 2009, doi: 10.1038/CDD.2009.44.
 355. W. Kriz, I. Shirato, M. Nagata, M. LeHir, and K. V. Lemley, "The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 304, 4, Feb. 2013, doi: 10.1152/AJPRENAL.00478.2012.
 356. S. U. Vogelmann, W. J. Nelson, B. D. Myers, and K. V. Lemley, "Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 285, 1, Jul. 2003, doi: 10.1152/AJPRENAL.00404.2002.
 357. M. Nagata, "Podocyte injury and its consequences," *Kidney Int.*, vol. 89, no. 6, pp. 1221–1230, 2016, doi: 10.1016/J.KINT.2016.01.012.
 358. M. Mohajeri and A. Sahebkar, "Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance: A review," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 122, 30–51, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2017.12.005.
 359. S. Y. Saad, T. A. Najjar, and A. C. Al-Rikabi, "The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats," *Pharmacol. Res.*, 43, 3, 211–218, 2001, doi: 10.1006/PHRS.2000.0769.
 360. M. A. Ibrahim, M. A. Morsy, H. M. Hafez, W. M. Gomaa, and A. M. Abdelrahman, "Effect of selective and non-selective cyclooxygenase

- inhibitors on doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats," *Toxicol. Mech. Methods*, 22,6, 424–431, Jul. 2012, doi: 10.3109/15376516.2012.666658.
361. L. Beroske, T. Van den Wyngaert, S. Stroobants, P. Van der Veken, and F. Elvas, "Molecular Imaging of Apoptosis: The Case of Caspase-3 Radiotracers," *Int. J. Mol. Sci.*, 228, 2021, doi: 10.3390/IJMS22083948.
 362. E. Eskandari and C. J. Eaves, "Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis," *J. Cell Biol.*, 221, 6, Jun. 2022, doi: 10.1083/JCB.202201159.
 363. B. S. Lee, S. H. Kim, T. Jin, et al., "Protective effect of survivin in Doxorubicin-induced cell death in h9c2 cardiac myocytes," *Korean Circ. J.*, 43,6, 400–407, Jun. 2013, doi: 10.4070/KCJ.2013.43.6.400.
 364. D. H. Kim, Y. J. Jung, J. E. Lee, et al., "SIRT1 activation by resveratrol ameliorates cisplatin-induced renal injury through deacetylation of p53," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 301, 2, Aug. 2011, doi: 10.1152/AJPRENAL.00258.2010.
 365. G. Liu, Q. Wang, Y. Shi, et al., "Resveratrol Attenuates Adriamycin-Induced Focal Segmental Glomerulosclerosis through C3aR/C5aR-Sphingosine Kinase 1 Pathway," *Pharmacology*, 100, 5–6, 253–260, Nov. 2017, doi: 10.1159/000479525.
 366. Q. Pan, X. Lu, C. Zhao, et al., "Metformin: the updated protective property in kidney disease," *Aging (Albany. NY)*, 12, 9, 8742–8759, May 2020, doi: 10.18632/AGING.103095.
 367. "Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16380497/> (accessed Jul. 15, 2022).
 368. S. Allouch and S. Munusamy, "Metformin attenuates albumin-induced alterations in renal tubular cells in vitro," *J. Cell. Physiol.*, 232, 12, 3652–3663, Dec. 2017, doi: 10.1002/JCP.25838.
 369. S. Lehtonen, "Metformin Protects against Podocyte Injury in Diabetic Kidney Disease," *Pharmaceuticals (Basel)*, 13, 12, 1–26, Dec. 2020, doi: 10.3390/PH13120452.
 370. G. Repossi, U. N. Das, and A. R. Eynard, "Molecular Basis of the Beneficial Actions of Resveratrol," *Arch. Med. Res.*, 51, 2, 105–114, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.ARCMED.2020.01.010
 371. H. Ferry-Dumazet, O. Garnier, M. Mamani-Matsuda, et al., "Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells," *Carcinogenesis*, 23, 8, 1327–1333, 2002, doi: 10.1093/CARCIN/23.8.1327.
 372. Y. Li, W. Lu, J. Yang, M. Edwards, and S. Jiang, "Survivin as a biological biomarker for diagnosis and therapy," *Expert Opin. Biol. Ther.*, 21, 11, 1429–1441, 2021, doi: 10.1080/14712598.2021.1918672.
 373. K. Ying-Jie, C. Ling-Wei, Z. Min, et al., "Resveratrol enhances chemosensitivity of renal cell carcinoma to paclitaxel," *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, 24, 8, 1452–1461, Jun. 2019, doi: 10.2741/4790.
 374. C. Yao, F. He, L. Liu, et al., "Sublytic C5b-9 Induces Glomerular

- Mesangial Cell Apoptosis Through miR-3546/SOX4/Survivin Axis in Rat Thy-1 Nephritis,” *Cell. Physiol. Biochem.*, 49, 5, 1898–1917, Oct. 2018, doi: 10.1159/000493652.
375. Z. Luo, W. Chen, W. Wu, *et al.*, “Metformin promotes survivin degradation through AMPK/PKA/GSK-3 β -axis in non-small cell lung cancer,” *J. Cell. Biochem.*, 120, 7, 11890–11899, Jul. 2019, doi: 10.1002/JCB.28470.
 376. L. Zheng, W. Yang, F. Wu, *et al.*, “Prognostic significance of AMPK activation and therapeutic effects of metformin in hepatocellular carcinoma,” *Clin. Cancer Res.*, 19, 19, 5372–5380, Oct. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0203.
 377. L. He, “Metformin and Systemic Metabolism,” *Trends Pharmacol. Sci.*, 41, 11, 868–881, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.TIPS.2020.09.001.
 378. “A study on the effect of resveratrol on lipid metabolism in hyperlipidemic mice - PubMed.” <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24653579/> (accessed Jul. 17, 2022).
 379. A. Rašković, V. Čučuz, L. Torović, *et al.*, “Resveratrol supplementation improves metabolic control in rats with induced hyperlipidemia and type 2 diabetes,” *Saudi Pharm. J. SPJ Off. Publ. Saudi Pharm. Soc.*, 27, 7, 1036–1043, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.JSPS.2019.08.006.
 380. M. Akbari, O. R. Tamtaji, K. B. Lankarani, *et al.*, “The effects of resveratrol on lipid profiles and liver enzymes in patients with metabolic syndrome and related disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials,” *Lipids Health Dis.*, 19, 1, Feb. 2020, doi: 10.1186/S12944-020-1198-X.
 381. T. Nihei, Y. Miura, and K. Yagasaki, “Inhibitory effect of resveratrol on proteinuria, hypoalbuminemia and hyperlipidemia in nephritic rats,” *Life Sci.*, 68, 25, 2845–2852, May 2001, doi: 10.1016/S0024-3205(01)01061-X.
 382. E. Molina-Jijon, S. Gambut, C. Macé, C. Avila-Casado, and L. C. Clement, “Secretion of the epithelial sodium channel chaperone PCSK9 from the cortical collecting duct links sodium retention with hypercholesterolemia in nephrotic syndrome,” *Kidney Int.*, 98, 6, 1449–1460, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.KINT.2020.06.045.
 383. L. Ju, X. Zhang, Y. Deng, *et al.*, “Enhanced expression of Survivin has distinct roles in adipocyte homeostasis,” *Cell Death Dis.*, 8, 1, Jan. 2017, doi: 10.1038/CDDIS.2016.439.
 384. J. J. Kim, J. M. David, S. S. Wilbon, *et al.*, “Discoidin domain receptor 1 activation links extracellular matrix to podocyte lipotoxicity in Alport syndrome,” *EBioMedicine*, 63, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.EBIOM.2020.103162.
 385. P. Ciobotaro, L. Drucker, A. Neumann, *et al.*, “The effects of doxorubicin on apoptosis and adhesion molecules of normal peripheral blood leukocytes-an ex vivo study,” *Anticancer. Drugs*, 14, 5, 383–389, Jun. 2003, doi: 10.1097/00001813-200306000-00010.
 386. R. J. Maas, J. K. Deegens, and J. F. Wetzels, “Permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome: historical perspectives and lessons for the future,” *Nephrol. Dial. Transplant*, 29, 12, 2207–2216, Dec. 2014,

doi: 10.1093/NDT/GFU355.

387. E. Strekalova, D. Malin, H. Rajanala, and V. L. Cryns, "Metformin sensitizes triple-negative breast cancer to proapoptotic TRAIL receptor agonists by suppressing XIAP expression," *Breast Cancer Res. Treat.*, 163, 3, 435–447, Jun. 2017, doi: 10.1007/S10549-017-4201-0.
388. B. Yang, S. Damodaran, T. A. Khemees, et al., "Synthetic Lethal Metabolic Targeting of Androgen-Deprived Prostate Cancer Cells with Metformin," *Mol. Cancer Ther.*, 19, 11, 2278–2287, Nov. 2020, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-1141.
389. A. Bhardwaj, G. Sethi, S. Vadhan-Raj, et al., "Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells," *Blood*, 109, 6, 2293–2302, Mar. 2007, doi: 10.1182/BLOOD-2006-02-003988.
390. S. Shankar, Q. Chen, I. Siddiqui, K. Sarva, and R. K. Srivastava, "Sensitization of TRAIL-resistant LNCaP cells by resveratrol (3, 4', 5 tri-hydroxystilbene): molecular mechanisms and therapeutic potential," *J. Mol. Signal.*, 2, 7, Aug. 2007, doi: 10.1186/1750-2187-2-7.
391. T. A. Lin, V. C. C. Wu, and C. Y. Wang, "Autophagy in Chronic Kidney Diseases," *Cells*, 8, 1, Jan. 2019, doi: 10.3390/CELLS8010061.
392. Z. Zhou, Y. Tang, X. Jin, et al., "Metformin Inhibits Advanced Glycation End Products-Induced Inflammatory Response in Murine Macrophages Partly through AMPK Activation and RAGE/NF κ B Pathway Suppression," *J. Diabetes Res.*, 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/4847812.
393. "[Effect of fenofibrate and metformin on lipotoxicity in OLETF rat kidney] - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16617360/> (accessed Jul. 16, 2022).
394. C. C. Wu, Y. S. Huang, J. S. Chen, et al., "Resveratrol ameliorates renal damage, increases expression of heme oxygenase-1, and has anti-complement, anti-oxidative, and anti-apoptotic effects in a murine model of membranous nephropathy," *PLoS One*, 10, 5, May 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0125726.
395. A. Sattarinezhad, J. Roozbeh, B. Shirazi Yeganeh, G. R. Omrani, and M. Shams, "Resveratrol reduces albuminuria in diabetic nephropathy: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial," *Diabetes Metab.*, 45, 1, 53–59, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.DIABET.2018.05.010.
396. K. Omachi, S. Kaseda, T. Yokota, et al., "Metformin ameliorates the severity of experimental Alport syndrome," *Sci. Rep.*, 11, 1, 7053, Dec. 2021, doi: 10.1038/S41598-021-86109-1.
397. T. Liu, L. Hong, Y. Yang, et al., "Metformin reduces proteinuria in spontaneously hypertensive rats by activating the HIF-2 α -VEGF-A pathway," *Eur. J. Pharmacol.*, 891, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2020.173731.
398. A. Song, C. Zhang, and X. Meng, "Mechanism and application of metformin in kidney diseases: An update," *Biomed. Pharmacother.*, 138, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2021.111454.



EKLER

EK-1: KISALTMALAR

NS	Nefrotik sendrom
APSGN	Akut poststreptokoksik glomerülonefrit
FSGS	Fokal segmental glomerüloskleroz
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
IV	Intravenöz
MezPGN	Mezengioproliferatif glomerülonefrit
MGN	Membranöz glomerülonefrit
MLH	Minimal lezyon hastalığı
MPGN	Membranoproliferatif glomerülonefrit
SLE	Sistemik lupus eritematozus
TG	Trigliserid
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein
TK	Total kolesterol
AMPK	5' Adenozin monofosfatla aktive olan protein kinaz
SDBY	Son dönem böbrek yetmezliği
MDH	Minimal değişiklik hastalığı
ANCA	Antinükleer antikor nötrofili
NSAİD	Non-steroid anti inflamatuvar ilaç
HIV	İnsan immün yetmezlik virusu
C	Kompleman
SMGN	Sekonder membranöz glomerülonefrit
PMGN	Primer membranöz glomerülonefrit
KBH	Kronik böbrek hasarı
GC	Glukokortikoid
SDNS	Steroid dirençli nefrotik sendrom
SYNS	Steroid yanıtı nefrotik sendrom
SBNS	Steroid bağımlı nefrotik sendrom

LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
WES	Tüm ekzom analizi
Th	T Helper
DUS	Doppler ultrasonografi
BT	Bigisayarlı tomografi
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
PE	Pulmoner emboli
TNF	Tümör nekrozis faktör
HMG-CoA	3-Hidroksi-3 Metilglutaril-Koenzim A
AKI	Akut böbrek hasarı
KDİGO	Böbrek hastalığı küresel sonuçlarının iyileştirilmesi
RALI	Rituksimab ilişkili akciğer hasarı
SIAD	Uyumsuz antidiürez sendromu
RSV	Resveratrol
TNFR	Tümör nekrozis faktör reseptörü
TRADD	Tümör nekrozis faktör reseptörü ilişkili ölüm oranı
FADD	Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini
DED	Ölüm efektör alanı
FasL	Fas ligandı
DISC	Ölüme neden olan sinyal hücreleri
RA	Romatoid artrit
APAF-1	Apopototik protez aktive edici faktör-1
Bcl-2	B hücreli lenfoma-2
TNF-a	Tümör nekrozis faktör alfa
CASP 3	Kaspaz 3
IAP	Apoptoz inhibitör protein
MOM	Mitokondriyal dış zar
TM	Transmembran
MOMP	Mitokondriyal dış zar geçirgenliği
Ub	Ubikuitin
XIAP	X'e bağlı apoptoz inhibitör protein
AML	Akut miyeloid lösemi

Ig	İmmunglobulin
RCC	Renal hücreli karsinom
ERK1 / 2	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar 1 ve 2



EK-2: ŞEKİL DİZİNİ

Şekil-1: SSNS'nin patogeneğinde muhtemelen rol oynayan moleküller.....	16
Şekil-2: Apoptotik sürecin gösterimi.....	33
Şekil-3: Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolları.....	35
Şekil-4: Apoptoz sırasında hücre içi sinyallerle aktiveleşen mitokondriyal yol.	38
Şekil-5: XIAP'nin protein alanları.....	52
Şekil-6: XIAP eksikliğinde gözlenen inflamatuvar fenomenin altında yatan hastalık patofizyolojisinin basitleştirilmiş modeli.....	55
Şekil-7: Survivin'in apoptoz inhibitör fonksiyonu.....	58
Şekil-8: Tüm gruplarda serum albumin, total kolesterol ve trigliserid değerlerinin karşılaştırılması.....	76
Şekil-9: Deney gruplarındaki [Grup 1 (Adriamisin), Grup 2 (resveratrol), ve Grup 3 (metformin)] idrar protein düzeylerinin 2. 4. ve 6. haftadaki değişimleri.....	76
Şekil-10: Deney gruplarındaki renal Survivin doku düzeyleri.....	78
Şekil-11: Deney gruplarındaki XIAP renal doku düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p>0.05).....	79
Şekil-12: Deney gruplarına ait Kaspaz-3'ün renal doku düzeyleri benzer bulundu (p>0.05).....	79
Şekil-13: Deney gruplarında ölçülen serum survivin düzeyleri.....	81
Şekil-14: Çalışma gruplarının XIAP Serum Düzeyleri.....	82
Şekil-15: Deney gruplarında serum Kaspaz-3 düzeylerinin Karşılaştırılması.....	83

Şekil-16: Serum albumin, total kolesterol ve 6. hafta idrar protein düzeylerini etkileyen faktörler (Lineer regresyon analizi, Forward Stepwise metod, $p<0.05$).....	85
Şekil-17: Deneysel nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlarda serum kreatinin değerleri ile doku survivin ve doku kaspaz 3 ilişkisi.....	86-87
Şekil-18: Deney 1,2 ve 3'te yer alan sıçanlarda, interstisyum hasar skoru ile 6. Hafta protein atılımı arasındaki ilişki.....	89
Şekil-19: Deneysel nefrotik sendrom oluşturulan ratlarda serum albümin düzeyleri ile serum survivin ve XIAP düzeyleri ile ilişkisi.....	91
Şekil-20: Nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlarda serum total protein düzeyleri ile glomerular hasar skoru ve renal doku XIAP düzeyleri arasındaki ilişki.....	92
Şekil-21: Nefrotik sendromlu sıçanlarda serum total protein düzeyleri ile renal doku survivin düzeyleri ve serum survivin düzeyleri arasındaki ilişki...	93
Şekil 22: Nefrotik sendromlu sıçanlarda serum trigliserid düzeyleri ile renal doku survivin arasındaki ilişki.....	94
Şekil 23: Nefrotik sendromlu sıçanlarda glomerular hasar skorları ile serum kaspaz-3 düzeyleri arasındaki ilişki.....	95
Şekil-24: Deney gruplarındaki patolojik preparatlarda elde edilen glomerul hasar skorlarının karşılaştırılması.....	96
Şekil-25: Deney gruplarındaki patolojik preparatlarda elde edilen tubulus hasar skorları.....	97
Şekil-26: Deney gruplarındaki İnterstisyum Hasar Skorları.....	98
Şekil-27: Grup 4 (kontrol) patolojik değerlendirme.....	99
Şekil-28: Grup 1 (adriamisin) patolojik değerlendirme.....	99

Şekil-29: Grup 2 (resveratrol Grubu) patolojik değerlendirme.....	100
Şekil-30: Grup 3 (metformin Grubu) patolojik değerlendirme.....	100

EK-3: TABLO DİZİNİ

Tablo-1: Nefrotik sendromun etyolojisi ve sınıflandırılması.....	6
Tablo-2: Nefrotik sendrom histolojik sınıflandırılması	7
Tablo-3: Normal ve nefrotik proteinüri	22
Tablo-4: KDIGO yönergelerinde kortikosteroid dozu.....	26
Tablo-5: Farmakoterapi dozlaması ve yan etkileri.....	28-29
Tablo-6: Kaspaz türleri.....	41
Tablo-7: Resveratrol'ün böbrek üzerine etkileri.....	66-67
Tablo-8: Çalışma gruplarının biyokimya sonuçları.....	75
Tablo-9: Çalışma gruplarının spot idrar protein düzeyleri (mg/dL).....	76
Tablo-10: Böbrek dokusu anti apoptotik proteinler (Sürvivin ve XIAP) ve kaspaz-3 düzeyleri (Median, minimum, maksimum).....	78
Tablo-11: Serum anti apoptotik protein (Sürvivin ve XIAP) ve kaspaz-3 düzeyleri (Median, minimum, maksimum).....	81
Tablo-12: Serum albumin, total kolesterol ve 6. hafta idrar protein düzeylerine en fazla etkili olan faktörler.....	85
Tablo-13: Deneysel nefrotik sendrom oluşturulan sıçanlarda ölçülen / skorlanan parametreler arasındaki korelasyonlar.....	89



TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime katkıda bulunan, tecrübe ve bilgilerini aktaran Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Nilgün KÖKSAL başta olmak üzere tüm öğretim üyelerine, tezimin konusunun belirlenmesinden, basılmasına kadar her aşamada, bilgi ve deneyimi ile yol gösteren, ilgisini ve desteğini esirgemeyen, danıştığım tüm konularda yardımcı olan değerli hocam, Prof. Dr. Bilal YILDIZ'a, laboratuvar çalışmasında desteklerini ve bilgi birikimlerini esirgemeyen Prof Dr. Ferah BUDAK ve Prof Dr. Emre SARANDÖL'e, patoloji preparatlarını titizlikle inceleyen,engin bilgi ve becerisiyle desteğini esirgemeyen Prof Dr Berna Aytaç VURUŞKAN'a, laboratuvar çalışmasında desteğini esirgemeyen, yardımlarıyla tez sürecini kolaylaştıran Dr. Abdurrahman ŞİMŞEK'e, uzmanlık eğitimi sürecinde her anlamda birbirimize destek olduğumuz, beraber çalışmaktan onur duyduğum asistan arkadaşlarıma, tüm hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen sevgili annem Hamide HAZAR ve babam Yaşar HAZAR'a, hayatıma bambaşka bir anlam katan biricik oğlum Berat'a tezimi hazırladığım tüm aşamalarda yanımda oldukları ve destek verdikleri için teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

..... yılında doğdum. İlköğretim 4. Sınıfı kadar Siirt 'in Baykan ilçesinde okudum. İlköğretim 4. Ve 5. Sınıf ve ortaokul eğitimimi İznik Kılıçarslan okulunda tamamladım. Lise eğitimimi İznik Anadolu Lisesinde 2006 yılında tamamladım. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesinde tıp eğitimime başladım. 2012 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. 2012-2013 yıllarında Ardahan Göle Devlet Hastanesi acil servisinde mecburi hizmet yaptım. 2014-2015 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında genel cerrahi ihtisası yaptım. 2015 yılında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında genel cerrahi ihtisasım devam ederken istifa ettim. 2016 yılında Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk sağlığı ve hastalıkları Anabilim dalında Pediatri ihtisasına başladım. 2020 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk sağlığı ve hastalıkları Anabilim dalına pediatri ihtisasımı tamamlamak üzere geçiş yaptım. O tarihten beri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk sağlığı ve hastalıkları Anabilim dalında pediatri ihtisasıma devam etmekteyim.