

AKUT PUROMYCİNE AMİNONUCLEOSİDE NEFROZDA PROTEİNÜRİ, KREATİNİN KLİRENSİ, SERUM ALBUMİN DEĞERLERİ İLE BÖBREK CİSİMCİĞİNDEKİ ULTRASTRÜKTÜREL DEĞİŞİKLİKLER VE SLİT-PORE SAYISI ARASINDAKİ İLİŞKİLER*

İsmail SEÇKİN, Mümin UZUNALAN, Meltem PEKPAK, Sibel KÖKTÜRK, Bülent URULUER, Hüseyin SÖNMEZ, Zeynep ÖZTÜRK, Güngör ŞATIROĞLU

Background and Design.- We tried to investigate in puromycine aminonucleoside (PAN) Wistar rats, (whom we injected subcutaneously 1.67 mg/100g PAN), the relationship of clinical proteinuria and morphological changes. In our groups 'before clinically established proteinuria' and after developed 'acute nephrosis', ultrastructural changes of the corpusculum renale Malpighi, morphologically alterations of the number of the slit-pores during developing proteinuria and the hydraulic permeability changes were correlated with the clinical parameters.

Result.- In the group with not yet established proteinuria podocytes were hypertrophied. The glomerular basement membrane was invaginated into the foot processes and thickened. Slit pore count was decreased in comparison to control rats (control: 32.68 ± 0.6 , 'before proteinuria': 16.3 ± 1.11). In the fused foot processes, which formed foot processes with an enlarged cytoplasm, we could see highly condensated microfilaments near the glomerular basement membrane.

In the 'acute nephrosis' group the slit-pores count were even more decreased (6.05 ± 1.54). In the rats which showed lesser proteinuria than others, in the acute group, protein absorption granules (PAG) and the different stages of PAG formation and secretion from podocyte were observed. In the rats with lower proteinuria we observed hypertrophy, increased endocytic activity, fused foot processes condensate electron dense microfilaments and PAG in the podocytes. Mesangial cells were increased. In the rats with high proteinuria, podocytic PAG and microfilaments were decreased and pseudocysts appeared. In the Cavum Bowmani, free apoptotic podocytes were to be seen. Foot processes slimmed, lengthened, fusion increased and high condensation of microfilaments disappeared. PAG were highly decreased. GBM was generally thinned and often nude GBM was noticed, with totally lost foot processes. In areas of degenerated podocytes, mesangial matriks expansion was attracting our attention. Close proximity to perimesangial area, within the increased mesangial matriks, electron dense deposits were observed.

Control group and the group 'before established proteinuria' were not significantly different from each other concerning the level of proteinuria, serum albumin and creatinine clearance. In the 'acute nephrosis' group proteinuria increased significantly from 5.04 ± 2 to 91.34 ± 91 mg/24 hours, serum albumin and creatinine clearance decreased from 3.23 ± 0.1 to 2.5 ± 0.63 g/dl, from 0.55 ± 0.8 to 0.38 ± 0.28 ml/min respectively.

Conclusion.- Our results showed us that in PAN nephrosis: 1-The firstly affected cells are the podocytes 2-There is a relationship between proteinuria, serum albumin and creatinine clearance loss and slit pore decrease 3-The podocytes first endocytose proteins and later with help of intracellular lysosomal activity, break them into pieces, to secrete them by exocytosis and use for all this the intracytoplasmic way 4-Loss of the foot processes or totally nude GBM areas are the real culprit of high levels of proteinuria and apoptosis in podocytes is induced.

Seçkin İ, Uzunalan M, Pekpak M, Köktürk S, Uruluer B, Hüseyin Sönmez, Zeynep Öztürk, Güngör Şatiroğlu. Acute Puromycine Aminonucleoside Nephrosis' Proteinuria, Creatinine-clearance, Serum Albumin Levels and the relationship of Slit-pore count and Ultrastructural Changes of the Corpusculum Renale Malpighi. Cerrahpaşa J Med 2004; 35: 102-114.

Glomerular kapiller duvar (GKD) glomerulusun hidroulik ve makromoleküler permeabilite özelliklerine önemli ölçüde katkıda bulunur.^{1,2} Yapılan deneysel ultrastrüktürel ve fonksiyonel çalışmalar GKD'nin makromoleküllerin

filtrasyonuna karşı hem büyüklük hem de şarj bariyeri oluşturduğunu göstermiştir.³⁻⁶ Böylelikle plazma proteinleri GKD'nin yüksek selektif fonksiyonu ve şarjın neticesi olarak kapiller lümende tutulurlar.

***Anahtar Kelimeler:** Ultrastrüktür, Protein absorpsiyon granülleri, Proteinüri, Morfometri, Apoptoz, Podosit; **Key Words:** Ultrastructure, Protein absorbtion granules, Proteinuria, morphomethria, Apoptosis, Podosit; **Alındığı Tarih:** 11 Mayıs 2004; Prof. Dr. İsmail Seçkin, Prof. Dr. Güngör Şatiroğlu, Uz. Bio. Mümin Uzunalan, Arş. Gör. Sibel Köktürk, Dr. Bülent Uruluer: İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul; Prof. Dr. Meltem Pekpak: İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Nefroloji Bilim Dalı, İstanbul; Prof. Dr. Hüseyin Sönmez, Uz. Dr. Zeynep Öztürk: İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul; **Yazışma Adresi (Address):** Prof. Dr. İsmail Seçkin, İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 34303, Cerrahpaşa, İstanbul

GKD'nin ultrastürüktürü ve onun permselectif özellikleri arasındaki ilişkinin anlaşılması zordur. İnsan glomeruler hastalığında proteinürinin patogenezi üzerinde tam bir fikir birliğine varılmamıştır. İnsan glomeruler hastalığı ve proteinüri ile karakterize edilen deneysel hayvan modelleri oluşturularak yapılan çalışmalarda, podosit ayakçıkları kaynaşması/çekilmesi ve dolayısıyla slit-pore sayısı azalması ile proteinüri arasında ilişkinin olduğu, podositler tarafından endositozisle alınan proteinlerin intrasitoplazmik vakuoler sistem yoluyla üriner sahaya transfer edildiği ve podosit ayakçıkları harabiyeti neticesi glomeruler bazal membran (GBM) üzerinde oluşmuş soyulmuş bölgelerin artmış permeabiliteden esas sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür.^{1,2,4,5,7-16} Ancak slit-pore sayısı (Podosit ayakçıkları sayısı) azalması ile makromoleküler permeabilite artışı ve hidroulik iletimdeki azalma arasındaki ilişki üzerine az sayıda kantitatif çalışma vardır.^{10,15} Yakın yıllarda podositlerin glomeruler hastalığın ilerlemesinde majör suçlu hücreler olduğu fikri değer kazanmaya başlamıştır.¹⁷⁻²⁰

Bizde oluşturduğumuz akut PAN nefrozda; A) Proteinüri başlangıcından önce BC'de ilk etkilenen hücre/hücreler hangileridir? B) Gelişen nefroz ile birlikte proteinüri, serum protein ve kreatinin klirensi değerleriyle BC'deki ultrastürüktürel ve slit-porelerdeki sayısal değişiklikler arasında muhtemel ilişkiler nelerdir? Sorularına cevap aradık.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Bu çalışmada erkek Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Bunlar her biri 6 sıçandan oluşan 3 gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol olarak kullanıldı. Grup II ve III'e her gün serum fizyolojikte çözüldürülmüş 1,67 mg/100 gr Puromycine aminonucleoside (PAN) subkutanöz olarak enjekte edildi. Sıçan gruplarında proteinüri değerinin 5. enjeksiyondan sonra tüm sıçanlarda 10 mg/24 saatin üzerine çıktığı 6. günü proteinürinin başlangıç günü olarak değerlendirdik (Tablo 1). Bu günü esas alarak; proteinürinin başlangıç değerlerine göre pek fazla gelişmediği 4. gün öldürülen sıçanlar proteinüri öncesi grubu olan grup II'yi, proteinürinin fazlaca geliştiği

10. gün öldürülen sıçanlarda akut nefroz grubu olan grup III'ü oluşturdu (Tablo 1). Sıçanların 24 saatlik idrarlarında proteinüri ölçümü biraz değiştirilmiş Triklorasetikasit (TCA) yöntemi ile²¹ yapıldı. Bütün hayvanlar öldürülmeden önce tartıldı, eter anestezisi altında alınan kan örneklerinde kreatinin ve albumin değerleri tespit edildi (Tablo 2). Daha sonra sol böbrek korteksi elektron mikroskopi E.M. incelemeleri için hazırlandı. Bunun için 1mm²'lik yapılan böbrek korteksi kesitleri önce (ph: 7,2) fosfat tamponu ile hazırlanmış %4'lük gluteraldehit ile ön ve sonrasında aynı tamponla hazırlanmış %1'lik O_s O₄ ile ikinci olarak fikse edildi. Dehidratasyonu takiben parçalar Araldit gömme ortamına alındı. Morfometrik incelemeler için Powell H.R (10)'nin metodu biraz değiştirilerek uygulandı. Her bir sıçan için 3 glomerulun her birinde 3 ayrı uygun periferik bölgeden 6000 büyütmede çekilen elektron mikrograflarda 6 cm'lik bazal membran bölgeleri değerlendirilerek (misina ipliği ile) 10µm'lik bazal membran sahasında podosit ayakçıkları arasındaki slit-pore sahasının sayımı yapıldı (Tablo 3). Perimezangial sahaslar değerlendirmeye katılmadı. Kan örneklerinde albumin (BCG) yöntemi ve kreatinin klirensi (KKr) (saffe yöntemi) belirlendi (Tablo 2).

BULGULAR

İdrar ve Kan Bulguları: Kontrol grupta proteinüri değerleri 4,87±3 mg/24 saat bulundu. Diğer gruplarda da PAN enjeksiyonu öncesi proteinüri buna yakın değerlerdeydi (Tablo 2). Grup II'de proteinüri değeri pek fazla yükselmemişti (4,59±37'den 5,557±2'ye). Serum albumin kontrol gruba göre anlamsız olarak 3,23±0,1'den 3,02±0,15'e kreatinin klirenside kontrol grubuna göre anlamsız olarak 0,554±0,24'den 0,496±0,16 ml/min azalmıştı (Tablo 2).

Akut nephrosis grubunda ise proteinüri değeri ortalaması anlamlı olarak başlangıç değerine göre 18 kat bir artış göstererek 5,04±2'den 91, 34±91 mg/24 saate yükselmişti. Bu grubumuzdaki 2 sıçanda bu artış daha da yükselecek 26 ila 36 kata çıkmıştı (131,9 ile 182,6 mg/

24 saat) (Tablo 1). Serum albumin değeri kontrol gurubuna göre anlamlı olarak azalarak 3.23 ± 0.1 'den $2,5 \pm 0,63$ g/dl'ye düşmüştü. Kreatinin klirensi ise kontrole göre anlamlı olarak $0,554 \pm 0,247$ 'den $0,348 \pm 0,28$ ml/min'ne azalmıştır (Tablo 2).

E.M. Bulguları: E.M. incelemelerinde kontrol grubuna ait Böbrek cisimciği (BC) resimleri Resim 1 ve 2'de gösterilmiştir. Protein öncesi grupta genellikle Bowman aralığı (KB) sahaları daralmıştı (Resim 3). Podositlerde hipertrofi, gerilme ve uzama (Resim 3, 4), Golgi kompleksi ve GER'de fazlaca gelişme, pek çok vesiküller (Resim 4), GBM'ye yakın bölgelerde mikrofilament artışı ve podosit ayakçıkları kaynaşma/çekilmeleri gözlemlendi (Resim 5). GBM'de podosit ayakçıkları içine doğru sık olarak fazlaca subepitelyal invaginasyonlara rastlandı (Resim 4).

Akut nephrosis grubu sıçanlarımızda gözlenen en belirgin özellik hipertrofik podosit sitoplazması içinde fazla sayıda ve değişik büyüklükteki protein absorpsiyon granülleri (PAG) idi (Resim 6,7). Podositlerin GBM'ye bakan hücre membranlarında sık olarak küçük invaginasyonlara ve giderek endositotik vesikül oluşumlarına rastlandı (Resim 8). Podosit sitoplazması içinde bu endositotik vesiküllerin toplandığı fagosomlar, lizozomlar ve residual body'lerin iri vesikülleri gözlemlendi. Residual body vesikülleri elektrondens görünümlü yaygın bir mikrofilament demetleriyle sıkıca sarılmışlardı (Resim 7, 9, 17). Bu residual body'lerin, içlerindeki elektrondens görünümlü materyali üriner sahaya sekret ettiği görüntülere sıklıkla rastladık (Resim 9). Bazı podositlerde bir endositotik vesikülden fagozomdan ve sonunda residual body oluşumuna ait çeşitli safhaları içeren görüntüler gözlemlendi (Resim 7, 9, 17).

Tablo I. Akut Nefroz Grubu Günlük Proteinüri Değerleri (9. Enjeksiyon sonrasında yüksek proteinüri gösteren sıçanlar)

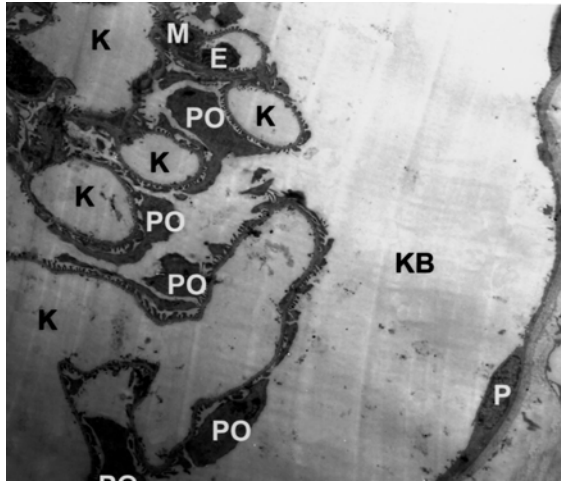
Proteinüri mg/24 saat	Enj. öncesi	1. Enj.	2. Enj.	3. Enj.	4. Enj.	5. Enj.	6. Enj.	7. Enj.	8. Enj.	9. Enj.
1. Denek	5,3	5,8	5,5	6,55	11,37	17,42	15,24	19,82	27,74	47,52
2. Denek	3,39	4,62	6,43	8,22	11,32	14,35	18,52	17,68	24,22	41,55
3. Denek	7,18	6,31	6,72	9,96	16,32	15,68	12,69	17,36	30,20	131,9*
4. Denek	4,64	4,25	3,8	4,87	8,03	12,59	14,28	18,04	25,67	76,53
5. Denek	4,58	4,2	4,67	6,46	6,41	12,56	19,67	26,95	33,16	67,91
6. Denek	5,19	4,29	4,4	4,39	12,81	15,03	12,28	23,42	76,45	182,6*
Ortalama	5,04±2	4,91±1,4	5,25±1,4	6,74±3,2	11,04±5,2	14,6±2,8	15,44±4,2	20,5±6,4	36,24±40	91,34±91

Tablo II. Kontrol, Proteinüri Öncesi ve Akut Nefroz gruplarında proteinüri, serum albümin, kreatinin klirens ve idrar volümü değerleri

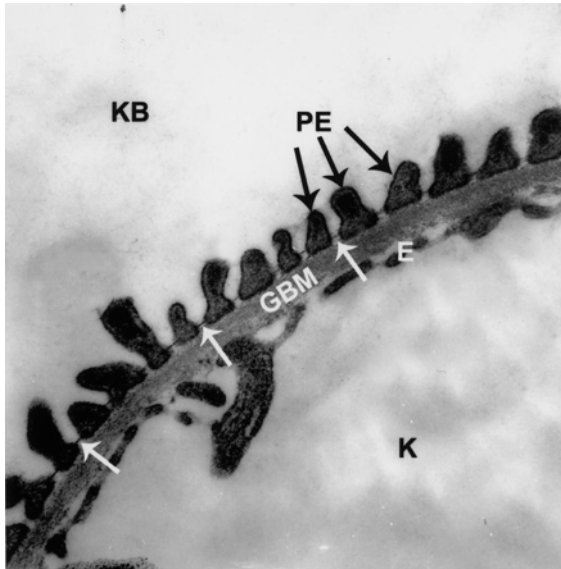
Gruplar	Proteinüri (mg/24 saat)	İdrar Volümü (cc/24 saat)	Serum Albümin (g/dl)	Kreatinin Klirens (ml/min)		
Kontrol	4,87±3	14,6±3,6	3,2±0,2	0,554±0,247		
Proteinüri Öncesi	Başlangıç 4,98±3,7	3 enj. S. 5,57±2	Başlangıç 12,3±5,3	3 enj. S. 10,6±3,6 p>0,05	3±0,2 p=0,25	0,496±0,16 p=1
Akut Nefroz	Başlangıç 5,04±2	9 enj. S. 91,34±91 p<0,05	Başlangıç 13,3±4	9 enj. S. 9±3 p<0,05	2,6±1 p<0,002	0,348±0,27 p=0,07

Tablo III. Kontrol, Proteinüri Öncesi ve Akut Nefroz gruplarında slit-pore sayısı

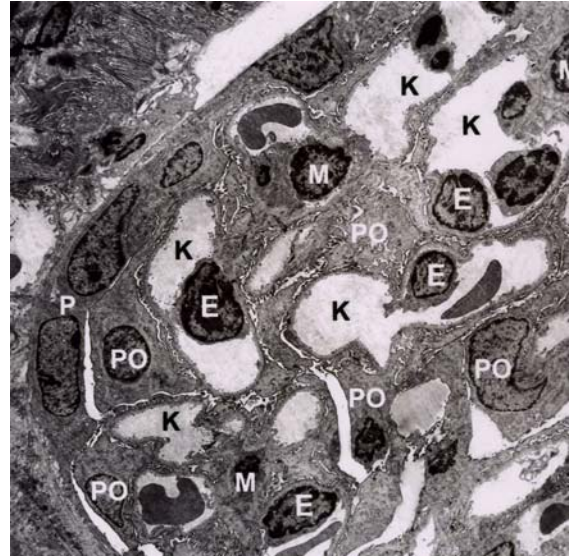
Gruplar	Ortalama Slit-pore Sayısı
Kontrol	32,68±0,62 p<0,05
Proteinüri öncesi	16,3±1,11 p<0,05
Akut nefroz	6,05±1,54 p<0,05



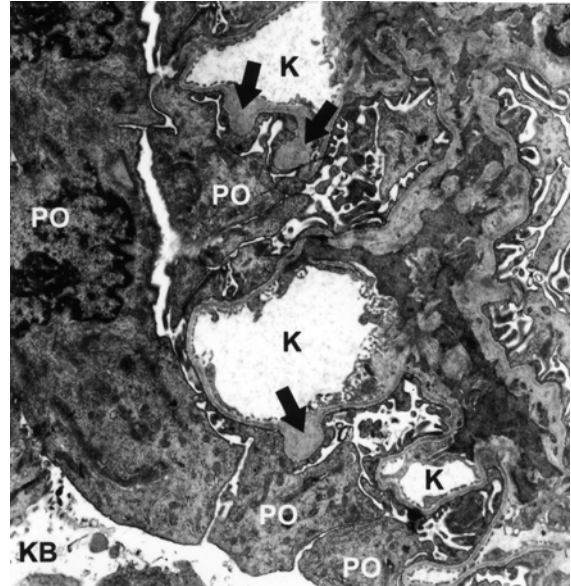
Resim 1: Kontrol grupta böbrek cisimciğinden bir bölge P: Parietal yaprak, PO: Podosit, K: Kapiller lümeni, M: Mesangial hücre, KB: Bowman aralığı, E: Endotel x1450



Resim 2: Kontrol grupta glomeruler filtrasyon bariyerinden bir bölge PE: Podosit ayakçıları, Beyaz ok: Slit Pore Membran, GBM: Glomeruler bazal membran, E: Delikli endotel, K: Kapiller lümeni, KB: Bowman aralığı x9500



Resim 3: Proteinüri öncesi grupta böbrek cisimciğinden bir bölge. Hipertrofik podositler (PO) dikkat çekmektedir. P: Parietal yaprak, M: Mesangial hücre, K: Kapiller lümeni, E: Endotel x1850

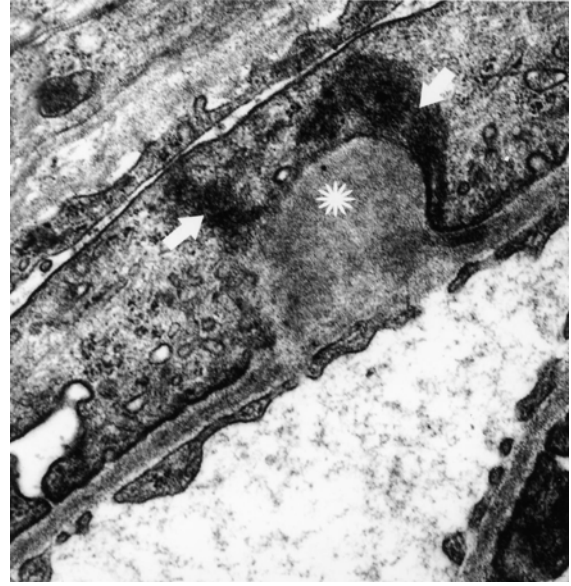


Resim 4: Proteinüri öncesi grupta hipertrofik, strüktürden zengin podositler (PO), fazlaca kalınlaşmış ve podosit ayakçılarına doğru invaginasyon yapan glomeruler bazal membran (ok). K: Kapiller lümeni, KB: Kavum Bovmani x1500

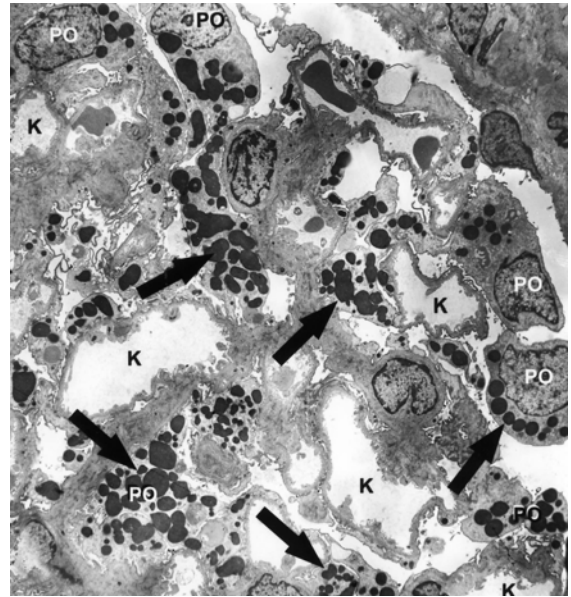
Podosit birincil çıkıntıları daha fazla mesafelere uzanacak şekilde GBM üzerinde yayılmıştı ve sitoplazmaları içinde artmış mikrofilament paketleri ihtiva ediyordu (Resim 10). Yan yana olan iki podosit ayakçıları arasındaki slit pore mesafe genellikle çok daralmıştı ve bazı

sahalarda membranlar arasında elektron yoğun köprüler mevcuttu (Resim 11, 12). Bu sahalarda slit-pore membranlar da daha apikal bir yerleşimdeydi (Resim 11, 12). Podosit ayakçıklarının birbirleriyle kaynaşarak gösterdiği görüntüye sıklıkla rastlandı (Resim 13, 14). Genellikle podosit ayakçıkları bu şekilde de GBM üzerinde incelmış olarak uzun mesafeler boyunca uzanıyorlardı (Resim 7, 9, 10, 14). Mezangial hücre artışı ve makrofajlar gözlemlendi (Resim 18). Özellikle proteinüri değerlerinin diğer sıçanlardan çok daha yüksek olduğu iki sıçanda podosit ayakçıkları fazlaca incelenerek GBM üzerinde fazlaca uzun mesafeler boyunca seyrettiği bazı bölgelerde parçalanıp GBM'den ayrılarak GBM'nin dış yüzeyinin çıplaklaştığı görüntüler gözlemlendi (Resim 14, 15). Bu sahalarda GBM'de incelmış bir görüntüdeydi (Resim 14, 15). Bu sıçanlarda podositlerde çok fazla incelmış sitoplazmik uzantılar, iri vesiküller ve pseudokistik yapılar, fazlaca azalmış PAG'leri gözlenirken yoğun mikrofilament demetleri kaybolmuştu (Resim 14). Bu sahalarda mezangial matriks'de fazlaca artmıştı (Resim 14, 16). Bowman aralığı içinde yer yer serbest apoptotik özellikler gösteren podositler gözlemlendi (Resim 14). Bazı BC'lerde podositlerin yer yer parietal yaprak hücreleriyle temasta olduğu bölgelere rastlandı (Resim 6, 10, 14, 18). Artmış mezangial matriks içinde ve peri mezangial alanlarda subepitelyal çıkıntılar içine yerleşmiş yaygın depozitler gözlemlendi (Resim 16). Yine perimezangial sahalarda eksternal yüzü çıplaklaşmış GBM bölgelerine ve bu sahalarda podosit hücre gövdesi doğru oluşmuş geniş, açık kenarı üriner sahaya temasta olan cep şeklinde çıkıntılara rastlandı (Resim 17).

Morphometrik Bulgular: Yaptığımız morphemetik çalışmada 10 mikronluk GBM sahasındaki slit-pore (Podosit ayakçıkları arasındaki saha) sayısı ortalaması kontrol grubumuzda $32,68 \pm 0,62$ idi. Bu sayı proteinüri grubumuzda anlamlı olarak azalarak $16,3 \pm 1,11$ 'e ve akut nephrosis grubumuzda ise anlamlı olarak $6,05 \pm 1,54$ 'e azalmıştı (Tablo 3). Her üç gruba ait işaretlenmiş 10 mikronluk sahanın E.M. fotoğrafı Resim 18'de gösterilmiştir.



Resim 5: Podosit ayakçıklarına doğru invaginasyon yapan GBM bölgesi invaginasyon bölgesinde GBM içinde elektrondens depozit (*) dikkat çekmektedir. Ok: Podosit ayakçıkları sitoplazması içinde yoğun mikrofilament demetleri x27000.

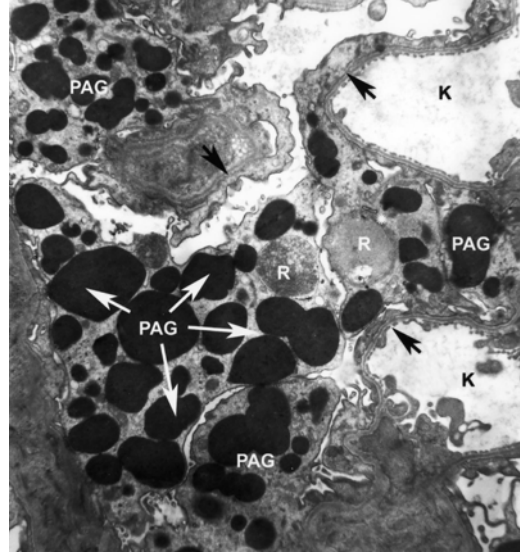


Resim 6: Akut grupta BC'den bir bölge. Hipertrofik podositler (PO) içinde çok sayıda fazlaca elektron dens protein absorpsiyon granülleri PAG (ok), K: Kapiller lümeni x2000

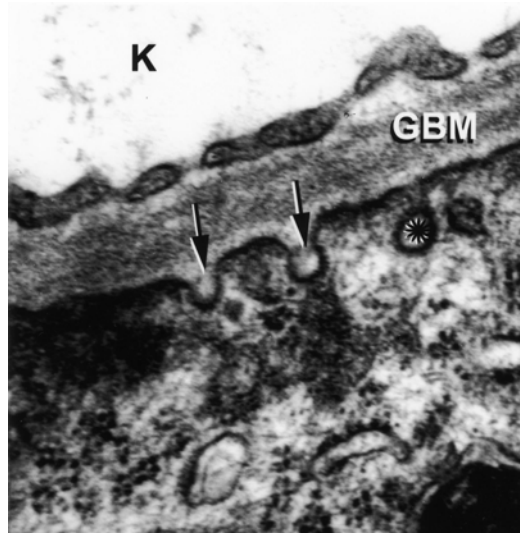
TARTIŞMA

İnsan glomerular hastalığında proteinürinin patogenezi üzerinde tam bir fikir birliğine varılamamış ve glomerular hasarın ilk hangi hücre-

de başladığı sorusu yeteri kadar aydınlatılamamıştır. Bizde oluşturduğumuz proteinüri öncesi grupta bu soruya cevap aradık. Protein öncesi grupta yalnızca podositlerde belirgin hipertrofi saptadık. Protein öncesi podosit hipertrofisi Messinave ark.⁷ tarafından gösterilmiştir. Shimojo²² 5/6 nefrektomize sıçanlarda glomerulosclerosisun başlangıç döneminde podosit sayısında artış olmaksızın glomerul hipertrofisi geliştiğini göstermiş ve glomerulosclerosisun başlangıç ve gelişiminden podositlerin sorumlu olabileceğini ileri sürmüştür. Yapılan çalışmalarda podositlerin belirli şartlar altında nükleer bölünme geçirdiği fakat sitokineze muktedir olmadığı böylelikle onların glomeruler kümenin substantial genişlemesine uymasının tek yolunun hücre hipertrofisi olduğu ifade edilmiştir.^{11,18,23,24} Yakın yıllarda yapılan çalışmalar podositlerin endotelin, PDGF, bFGF gibi mesangial hücre growth faktörlerini ürettiklerini^{17,25,26} ve podosit hasarının mesangial hücre proliferasyonunu ve matriks genişlemesinin önemli bir faktörü olduğunu^{18,19,27} göstermektedir. Böylelikle podositlerden türemiş sitokinlerin glomeruler hastalığın ilerlemesinde ilk adım olabileceği desteklenmiştir. Bu grupta proteinüri gelişmemesine rağmen gözlediğimiz podosit ayakçıkları kaynaşması ve slit-pore azalması bu tip lezyonların proteinüri sonucu oluşmadığını göstermektedir. Kaynaşmış podosit ayakçıkları normal podosit ayakçıklarından daha yoğun görülen mikrofilament paketlerinin topluluklarını ihtiva ettiği gösterilmiştir.^{11,13} Shirato ve arkadaşları da "Masugi nefriti yaratarak" mikrofilament artışını göstermişler ve podosit ayakçıkları bu şekilde kontraktıl bölgeleri geliştirerek adeta membrandan ayrılmamak için bir şekil değişikliğine uğradıkları ve glomeruler kapillerlerin desteklenmesi için kontraktıl sistemin bu değişimi geçirdiğini ileri sürmüşlerdir.²⁸ Bizde podosit ayakçıklarında artmış mikrofilament sahalalarının ve genişlemiş GBM bölgelerinin bu grupta henüz gelişmemiş proteinüriya bağlı olarak özellikle proteinlerin geçişine ve mezangial matriks artışına karşı ve fazlaca gelişmiş direnç bölgeleri olarak değerlendirdik.



Resim 7: Akut grupta hipertrofik podositler içinde PAG ve residual body'ler (R). Residual body membranları etrafında yoğun mikrofilamentler(*). GBM üzerinde Podosit ayakçıklarında kaynaşma/çekilme bölgeleri dikkat çekmektedir (ok). K: Kapiller lümeni x6300



Resim 8: Akut grupta podosit ayakçıkları GBM'ye bakan hücre membranında endositotik vesikül oluşum safhaları, Ok: Başlangıç membran invaginasyonları, (*) oluşmuş endositotik vesikül, K: Kapiller Lümeni x60000

Akut nefroz grubunda podosit ayakçıkları kaynaşmaları daha da artmış dolayısıyla slit pore sayısı azalmıştı ($6,05 \pm 1,54$ $p < 0.005$). Podosit ayakçıkları kaynaşmasından dolayı glomeruler slit pore membranların total uzunluğundaki azalmanın glomeruler hidroulik permeabilitede^{1,2,16} ve serum albuminde¹ azalma hasıl ettiği ileri sürülmüştür. Bizde bu grupta

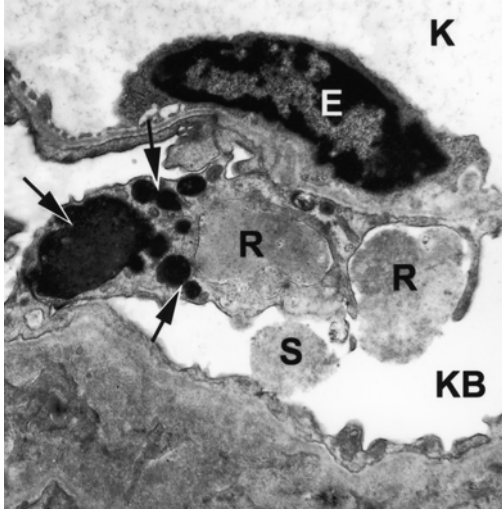
bu araştırmacıları destekler şekilde azalan idrar volümü, kreatinin klirensi ve serum albumin gözledik. Slit pore aralıklar fazlaca daralmış ve karşılıklı podosit ayakçıkları membranları arasında elektron yoğun köprüler mevcuttu. Patolojik şartlarda slit porelerin dar olduğunu ve sıkı bağlantılar yaptığı gösterilmiştir.^{12,19} Ayrıca biz podosit ayakçıkları azalmasının podosit ayakçıkları kaynaşması neticesi olduğunu destekleyen görüntülere sıklıkla rastladık (Resim 11, 12). Bu çalışmamızda saptadığımız proteinüri ile slit-pore azalması arasında ilişki insan^{10,29,30} ve deneysel çalışmalarda^{7,8,10,12,13,15} gösterilmiştir. Ancak bu kaynaşma/çekilmenin altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır.^{13,31} Glomeruler filtrede farklı negatif yüklerin hem podosit ayakçıkları şekli için hem de proteinlerin glomeruler permeabilitesi için öneme sahip olduğu gösterilmiştir.^{6,32} İnsan ve deneysel proteinürik durumlarda epitel hücrelerindeki yüzey aniyonlarının kaybolması veya bloklanması podosit ayakçıkları süratli kaynaşmasının sebebi olarak gösterilmiştir.^{3,32-34} Yakın bir çalışmada heparanasenin proteinürida ki glomeruler şarjın kaybıyla ilgili olabileceği ileri sürülmüştür.³⁵ Bunun yanında oksijen radikalleriyle depolimerizasyonunda GBM'nin şarj değişikliğinden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür.^{36,37} Slitpore'lar zonula occludens proteini (ZO-1). FAT (Drosophila tümör süppresör FAT'nin insandaki karşılığı) ve p-cadherin içerirler ve aktin skeletone bağlanırlar. Slit diafragmlarda nefrin, podosin ve CD2AP (podosin ile birlikte filtrasyonda yer almakta) gibi proteinler saptanmıştır.^{18,38} Nefrin'in Fin tipi konjenital nefrotik sendromun sorumlusu olduğu bildirilmiştir.³⁹ Nefrin azalması çoğu patolojilerde proteinüri ve podosit kaybı ile birlikte görülür. PAN nefroz modelinde podosin ve nefrin seviyelerinin %10 ile %25 normalden düşük bulunmuştur.⁴⁰

Akut nefroz grubunda en dikkat çekici yapı olarak hipertrofi gösteren podositler içinde değişik sayı ve büyüklükteki elektron yoğun protein absorpsiyon granüllerini (PAG) gözledik. Araştırmacılar bu absorpsiyon dropletlerinin mevcudiyetinin proteinürininin bir morfolojik indikatörü olduğunu ifade etmişlerdir.^{7,12,13} Nefrotik sıçanlarda izleyici teknikler kullanılarak

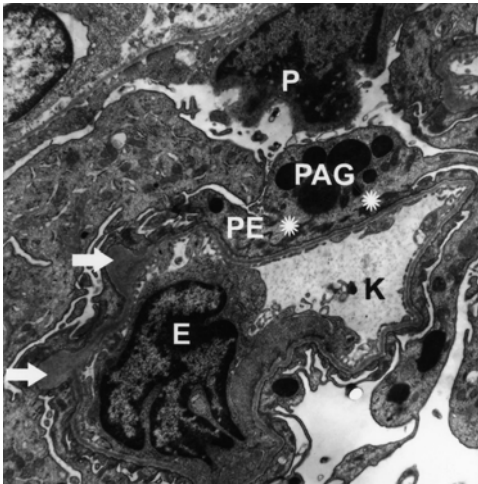
yapılan çalışmalarda podositler vasıtasıyla protein alınımının podosit ayakçıkları bazalindeki plazma membranı vasıtasıyla endositotik bir yollu olduğunu ve hücre içindeki vakuollerde (fagozom) biriken bu vesiküllerin ihtivalarının giderek artan konsantrasyonları ile elektron dens bir görüntü kazanarak protein absorpsiyon granüllerinin oluştuğunu göstermiştir.^{13,41,}

⁴² PAG bu konsantrasyon işlemleri esnasında primer ve sekonder lizozomlarla kaynaşarak lizozomal enzimleri kazanır ve içindeki ihtivalarının erimesi neticesinde de daha az yoğun ve heterogenoz olan residual bodyler oluşur. Bu residual bodyler etraflarını çevreleyen yoğun mikrofilament paketleriyle tanınmakta ve eksositoz yoluyla içeriklerini üriner sahaya boşaltmaktadırlar.^{13,41,42} Bizde çalışmamızda bu elektron dens PAG'i yanında bunun tüm oluşum safhasına ve sonrasında oluşan etrafi mikrofilamentlerle sarılı residual bodyleri ve bunların tam sekresyon esnasındaki görüntülerine sıklıkla rastladık. Sıçanlara PAN uygulaması ile yapılan bir deneysel çalışmada PAN uygulamasının 7. gününde sık olarak görülen bu granüllerin 12. günde belirgin olarak daha az görüldüğü belirtilmiştir.⁷ PAN'ın epitel hücre endositotik aktivitesini hasara uğrattığı ve hücrelerin içindeki birleşmelerin daha sonraki ilerlemelerini etkilediği gösterilmiştir.¹⁴ Bizde bu grubun yüksek proteinüri gösteren 2 sıçanında, podositler içinde PAG granüllerinin ve elektron yoğun mikrofilament demetlerinin fazlaca azaldığını ve büyük pseudokistik yapılar oluştuğunu gözledik (Resim 13). Whiteside ve arkadaşları PAN proteinürik sıçanlarda başlangıçta podosit sitoskeletonunda agregasyon görüldüğünü, proteinürininin artışı ile birlikte sitoskeletonun tamamen disaggregasyona uğradıktan sonra bazal membrandan ayrılma gerçekleştiğini bildirmişlerdir.⁴³ Böylelikle yukarıdaki araştırmacıları destekler şekilde podositlerin azalan mikrofilament yoğunluğuna bağlı olarak azalan endositotik aktiviteleri neticesi yeni PAG granülleri oluşturmadığını, daha önce oluşmuş residual body'lerinde mikrofilament azalmasına bağlı olarak daha fazla hücre içinde ilerleyemediğini ve içindeki partikülleri eritip daha fazla bir büyüklüğe ulaşarak böyle pseudokistik yapılar oluşturduğunu, bu yapıların

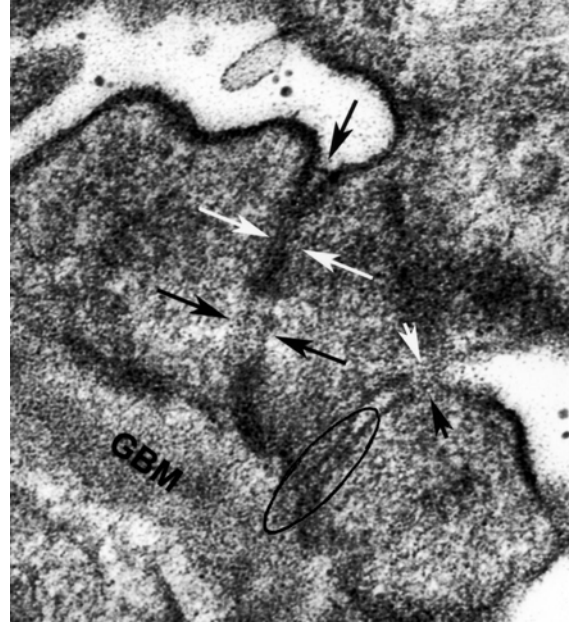
duvarlarının koparak içeriklerini üriner sahaya boşalttıklarını düşündük. Bu grubumuzda podositler içinde gözlediğimiz fazlaca pseudokistler, primer çıkıntılarda aşırı uzama ve incelmeler diğer araştırmacılar tarafından da ifade edilmiştir.^{11,13,14} Yine bu sıçanlarda sıklıkla rastladığımız podosit ayakçıkları kaybı neticesi oluşmuş soyulmuş GBM bölgelerinin de bu sıçanlardaki yüksek proteinüri'dan esas sorumlu sahalar olduğunu düşündük.



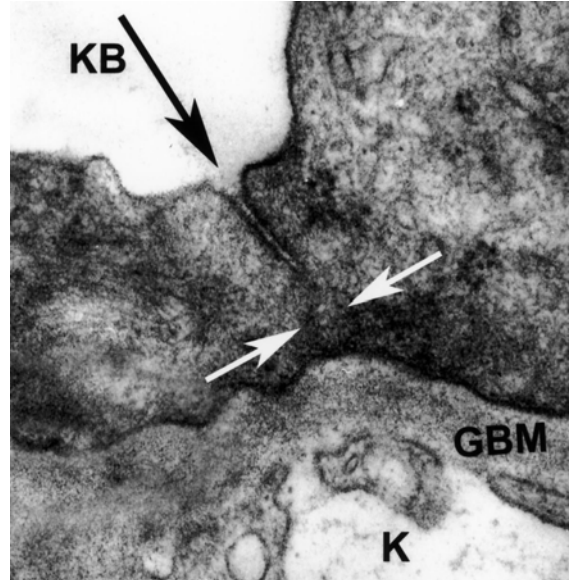
Resim 9: Akut grupta podositte eksositozla içeriğini dışarı sekretmiş olan residual body (R), S: Bowman aralığı (KB) içine atılmış sekresyon ürünü, K: Kapiller lümeni, E: Endotel, (ok): PAG x10600



Resim 10: Akut grupta GBM üzerinde fazlaca kaynaşmış/çekilmiş podosit ayakçıkları (PE) ve içinde yoğun mikrofilament demetleri (*). GBM'de podosit ayakçıkları içine invaginasyon şeklinde kalınlaşmış bölgeler (ok), podosit ile parietal yaprağı (P) yer yer temas bölgeleri görülmektedir. K: Kapiller lümeni, PAG: protein absorpsiyon granülleri, E: Endotel x6000



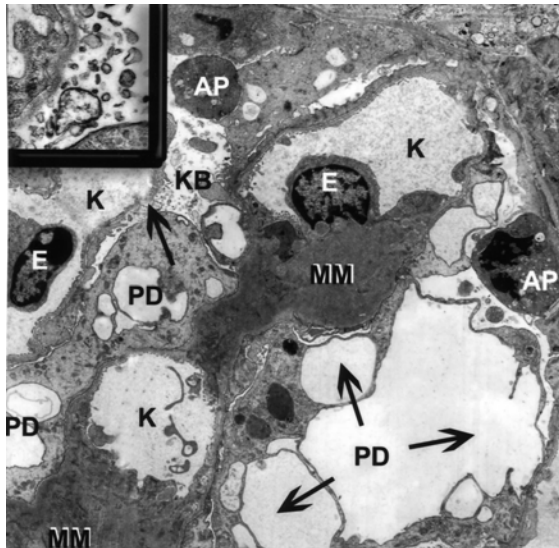
Resim 11: Akut grupta podosit ayakçıkları arasında fazlaca daralmış (Beyaz ok) ve kaynaşmış (Siyah oklar arası) slit pore bölgeleri. İki podosit ayakçıkları arasında fazlaca yukarı çekilmiş slit-pore membran (Siyah ok). Yanındaki slit-pore bölgesinde yakın podosit ayakçıkları arasında tekrarlanmış elektron yoğun köprüler (daire içine alınmış) ve kaynaşma (Siyah ve Beyaz oklar arası) görülmektedir x31500.



Resim 12: Akut grupta GBM üzerinde kaynaşma (Beyaz oklar arası) gösteren iki podosit ayakçıkları. KB: Bowman aralığı, K: Kapiller lümeni, Siyah ok: Yukarı pozisyonda yerleşmiş slit-pore membranı x31500.

GBM'nin soyulmasına glomeruler hastalığın deneysel modelleri kadar insan biyopsi/

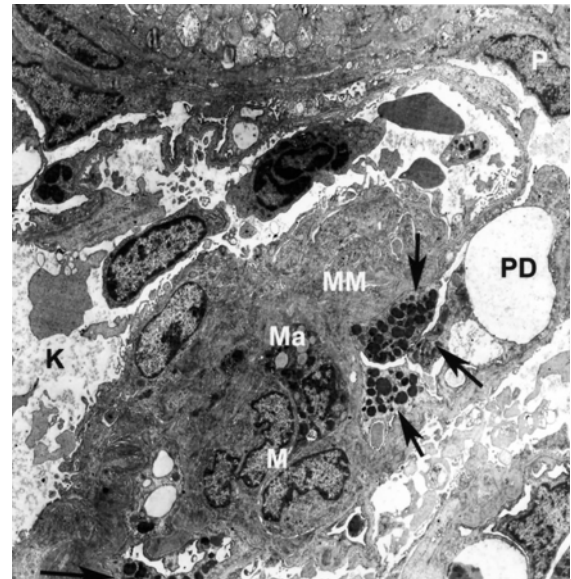
otopsi materyalinde de sıklıkla rastlanır.^{9,29,30} Böylelikle bu bölgelerin proteinüri patogenezi-
sinde bir önemli rol oynaması çok muhtemel-
dir. Çeşitli araştırmalarda proteinüri gelişimi ile
podosit ayakçıları GBM'den ayrılmasıyla
oluşmuş bu soyulmuş GBM bölgeleri arasında
ilişki kurmuşlardır.^{5,7,11,13,29,30} Glomerular filt-
rasyonun podositlerin hücre-hücre ve hücre-
matriks arasındaki teması bağı olduğu yapılan
moleküler çalışmalarla desteklenmiştir. Podo-
sitlerdeki aktin skeletonunun apikal, lateral ve
bazal olmak üzere 3 farklı podosit bölgesi ile
temas kurduğu lateralde caterin ve adaptör pro-
tein ZO-1 lerle lateral slit diyafragma, bazalda
ise integrinler ve distroglycanlarla podosit
ayakçıları altındaki GBM'ye bağlandığı ve bu
bölgelerde oluşan hasarın podosit ayakçıları
silinmesi, GBM soyulması, proteinüri/nefritik
sendrom ile sonuçlandığı ileri sürülmüştür.^{18,38,44,45}



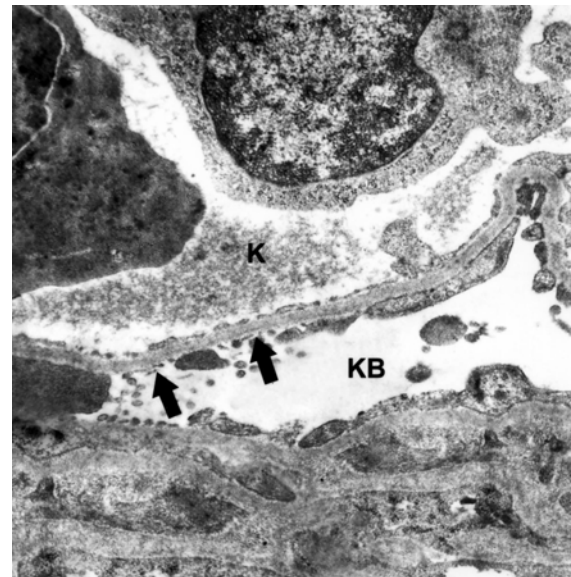
Resim 13: Akut grupta pseudokistik dejenerasyonlar (PD) gösteren podositler, KB de apoptotik podositler (AP) ve artmış depozitli mezangial matriks (MM) görülmektedir. GBM de bir sahada çıplaklaşma mevcuttur (ok). PAG' da azalma dikkat çekicidir. K: Kapiller lümeni, E: Endotel x2900 (Büyütülmüş Resim: Çıplaklaşmış GBM bölgeleri, podosit ayakçıları kalıntılarının oluşturduğu villöz görüntüler ve GBM'de incelme dikkat çekicidir x27000)

Yüksek proteinüri gösteren iki sıçanda da daha fazlaca mesangial matriks artışına rastladık. Yakın yıllarda yapılan çalışmalarda podosit yaralanmasının mesangial hücre proliferas-

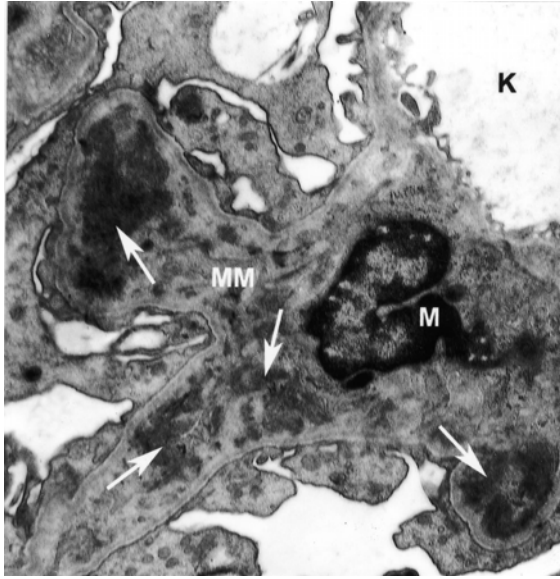
yonu ve matriks genişlemesinin bir önemli faktörü olduğu^{16-19,27} ve farklı mesangial hücre growth faktörleri^{17,25,26} ile mesangial hücre proliferasyonu inhibitörleri²⁵ ürettikleri ve böylelikle podositlerin mesangial hücre davranışlarını etkilediklerini desteklemiştir. Bizim çalışmamızda da mesangial hücre proliferasyonu ve mesangial matriks artışının podosit hasarından daha sonra ortaya çıkması bu bulgular ile paralellik göstermektedir.



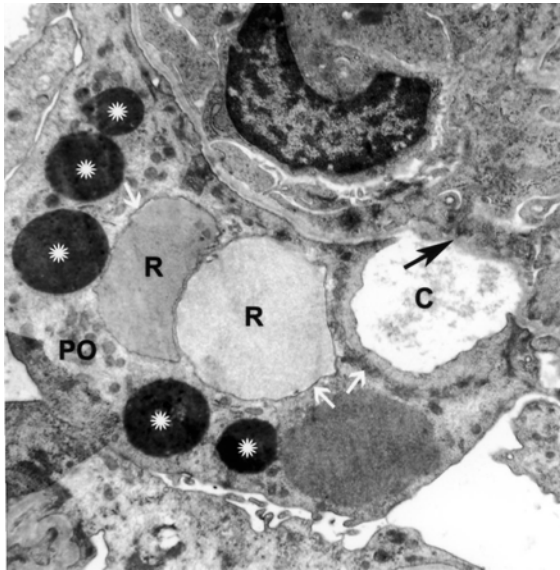
Resim 14: Akut grupta çıplaklaşmış GBM bölgeleri (ok). K: Kapiller Lümeni, KB: Bowman aralığı x12200.



Resim 15: Akut grupta artmış mesangial matriks (MM) içinde yoğun depozitler (ok) görülmektedir. M: Mezangial hücre, K: kapiller lümeni x7800



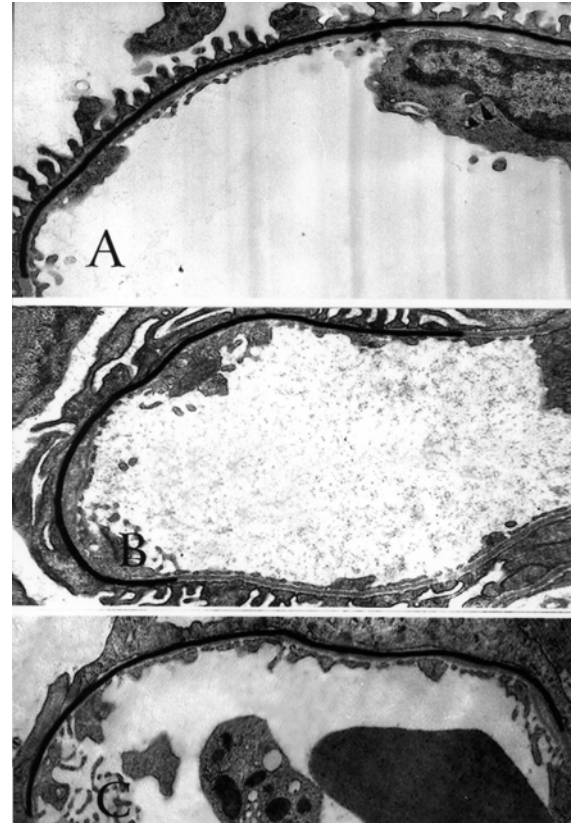
Resim 16: Akut grupta hipertrofik podosit içine doğru oluşmuş cep şeklinde bowman aralığı (C). Bu sahada GBM'de çıplaklaşmış bir görüntüdedir (Siyah ok). Hipertrofik podosit (PO), PAG (*) ve residual bodyler (R) içermektedir. Cep şeklinde boşluk ve residual body hücre membranları etrafında yoğun mikrofilyamentler (Beyaz ok) dikkat çekmektedir x6600



Resim 17: Akut grupta artmış mesangial matriks (MM) içinde mezangial hücre (M) proliferasyonu görülmektedir. Ma: Makrofajlar, (ok): PAG, K: Kapiller lümen, PD: Podositte pseudokistik dejenerasyon, P: Parietal yaprak x2470.

Yakın yıllardaki deneysel⁴⁶⁻⁴⁹ ve insan^{50,51} glomeruler hastalıklarında podositlerin apoptozise uğrayabileceği ve böylelikle proliferasyon eksikliği olan podositlerin sayılarındaki

azalmayla glomerulosclerosis gelişimi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Biz çalışmamızda podosit sayısı üzerine bir morfometrik çalışma yapmadık. Ancak akut nefroz grubunun yüksek proteinüri gösteren sıçanlarında mezangial matriks artışı gözlediğimiz sahalarda podositlerin daha az olduğunu ve Bowman aralığı içinde de serbest apoptotik podositler bulunduğunu gözledik (Resim 13). Bulgularımız araştırmacıların düşüncelerini desteklemektedir.



Resim 18: A: Kontrol, B: proteinüri öncesi, C: akut nefroz gruplarında işaretlenmiş 10µm GBM sahasında (Siyah Çizgi) slit-pore sayımı x6000.

Bu sıçanlarda mesangial sahada ve genellikle perimesangial GBM'ye yakın bölgelerde depozitlere rastladık. Bu depozitler genellikle podosit ayakçıkları içine doğru subepitelyal dikenli çıkıntılarının içinde yerleşmişlerdi. Yapılan çalışmalarda albumin, transferin ve İgG GBM'den geçmesine rağmen moleküler ağırlığı daha fazla olan İgM'nin kapillerlerin daha ince bazal membrana sahip juxtamesangial bölgesinden mesangial matrikse geçtiği gösterilmiştir.³¹ Böylelikle biz mesangial bölgede ve

perimesengial GBM bölgesindeki subepitelyal depozitlerin mesengial matrikste biriken bu tip ümmunglobulinler (İgM) olabileceğini ve podosit ayakçıkları vasıtasıyla sarılarak intrastoplazmik yolla üriner sahaya taşınabileceklerini düşündük. Podositlerde gözlediğimiz üriner sahaya açılan ceplerinde (Resim 16) bu şekilde olduğu böylelikle bu yapıların ağır immunoglobülinler için başlangıçta intrastoplazmik daha sonra podosit ayakçıkları kaybıyla oluşan çıplaklaşmış GBM (Resim 16) vasıtasıyla bir direkt geçiş yolu oluşturduğu ve fazlaca yükselen proteinüradan sorumlu olabileceğini destekledik. Bu ceplerin patolojik durumlarda artmış permeabilite bölgeleri olarak podositlerin GBM'ye adhesyonunun azaldığı fokal sahalar da ortaya çıktığı ve artmış protein üriadan sorumlu olabilecekleri ileri sürülmüştür.^{8,13,20}

Bulgularımız bize; 1- İlk etkilenen hücrelerin podositler olduğu. 2- Podositlerin erken dönemlerde fazlaca mikroflament ve GBM esas maddeleri sentezlediği ve böylelikle intrastoplazmik yoğun mikroflament paketleri ve GBM kalınlaşması oluşturarak glomeruler permeabiliteye ve mesengial matriks artışına karşı kontraktıl direnç bölgeleri oluşturduğu 3- Proteinüri artışı, serum albumin, kreatinin-klirensi azalması ile slit pore azalması arasındaki ilişki olduğu 4- Başlangıçtaki protein geçişinden podositler tarafından endositozla alınana proteinlerin hücre içi lizozomal aktivite ile parçalanarak eksositoz ile sekret edildiği intrastoplazmik yolun kullanıldığı 5- Nefroz ilerlemesiyle; podositlerde aşırı dejenerasyon neticesi geniş pseudokistik vesiküller olduğu, PAG granüllerinin fazlaca azaldığı, podosit ayakçıklarındaki elektron yoğun mikroflamentlerinin giderek kaybolduğu, podosit ayakçıkları fazlaca incelendiği yada parçalanarak tamamı ile kaybolduğu, böylelikle oluşan çıplaklaşmış GBM bölgelerinin yüksek proteinüriden esas sorumlu bölgeler olduğu ve podositlerde apopitoz görüldüğü, 6- Podositlerin uğradıkları hasar ile mesangial matriks artışı arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

ÖZET

Biz Puromycine Aminonucleosiden (PAN)-'nin Wistar sıçanlara subkutanöz enjeksiyonu ile (1,67 mg/100 gr), proteinüri gelişmeden önceki "proteinüri öncesi" ve belirgin proteinüri gelişmiş "akut nefroz" sıçan gruplarında Böbrek cisimciği deki ultrastrüktürel değişiklikler ve slit-porelerdeki sayısal farklılıklar ile gelişen proteinüri ve hidrolik permeabilite arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Proteinüri öncesi grupta podositlerde hipertrofi, mikroflament artışı, podosit ayakçıkları kaynaşması, glomeruler bazal membran kalınlaşması ve invaginasyon gözlemlendi. Slit-pore sayısı kontrol gruptakinden belirgin olarak azalmıştı (Kontrol: 32, 68±0,6 proteinüri öncesi: 16,3±1,11).

Akut nefroz grubunda slit-pore sayısı daha da azalmıştı (6,05±1,54). Bu grubun düşük proteinüri gösteren sıçanlarında podositlerde hipertrofi, mikroflament ve endositotik aktivite artışı ve buna bağlı çok sayıda protein absorpsiyon granülleri (PAG), podosit ayakçıklarında kaynaşma görüldü. PAG'ların oluşum ve podositlerden sekret edildiği aşamalara ait görüntülere rastlandı. Mezengial hücre artışı görüldü. Bu grubun yüksek proteinüri gösteren sıçanlarında ise podositlerde mikroflamentlerde ve PAG'da azalma ve pseudokistik yapılar gözlemlendi. Bowman aralığında apopitotik podositlere rastladık. Podosit ayakçıkları incelmış uzamış ve kaynaşmalar artmıştı. GBM'lerde incelmeye podosit ayakçıkları, kaybolduğu çıplaklaşmış GBM bölgelerine sıklıkla rastlandı. Perimesengial sahaya yakın artmış mezengial matriks içinde depozitler görüldü.

Proteinüri öncesi grubun laboratuvar bulgularında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Akut nefroz grubunda ise proteinüri 5,04±2'den 91,34±91 mg/24 saate yükseldi. Serum albumin anlamlı olarak 3,23±0,1'den 2,5±0,63 g/dl'ye, kreatinin klirensi ise anlamlı olarak 0,55±0,8'den 0,38±0,28 ml/min'e azaldı.

Bulgularımız bize PAN nefrozda; 1- İlk etkilenen hücrelerin podositler olduğu, 2- Proteinüri artışı serumalbumin ve kreatinin kliren-

si azalması ile slit-pore sayısı azalması arasında ilişki olduğu, 3- Başlangıçtaki protein geçişinde podositlerle endositozla alınan proteinlerin lizozomal aktivite ile parçalanarak sekret edildiği intrasitoplazmik yolun kullanıldığını, 4- Yüksek proteinüridan ise podosit ayakçıklarını kaybı neticesi oluşmuş çıplaklaşmış GBM bölgelerinin sorumlu olduğu ve podositlerde apoptozisin indüklendiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bohman S-O, Jaremko G, Bohlin A-B, Berg U. Foot process fusion and glomerular filtration rate in minimal change nephrotic syndrome, *Kidney Int* 1984; 25: 696-700.
2. Daniels BS. The role of the glomerular epithelial cell in the maintenance of the glomerular filtration barrier, *Am J Nephrol* 1993; 13: 318-323.
3. Caulfield JP, Farquhar M.G. Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis, *Lab Invest* 1978; 39: 505-512.
4. Weening JJ, Rennke HG. Glomerular permeability and polyanion in Adriamycin nephrosis in the rat, *Kidney Int*, 1983; 24, 152-159.
5. Whiteside C, Prudis K, Cameron R, Thompson J. Glomerular epithelial detachment, not reduced charge density, correlates with proteinüri in adriamycin and puromycin nephrosis, *Lab Invest*, 1989; 61: 6, 650-660.
6. Caulfield JP, Farquhar MG. Distribution of anionic sites in glomerular basement membranes: Their possible role in filtration and attachment, *Proc Natl Acad Sci, USA* 1976; 73: 1646-1650.
7. Messina A, Davies DJ, Dillane PC, Ryan GB. Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinüri in aminonucleoside nephrosis, *Am J Pathol*, 1987; 126: 220-229.
8. Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural of mechanism of proteinüri in aminonucleoside nephrosis, *Kidney Int* 1975; 8: 219-232.
9. Kanwar YS, Rosenzweig LJ. Altered glomerular permeability as a result of focal detachment of visceral epithelium, *Kidney Int* 1982; 21: 565-574.
10. Powell HR. Relationship between proteinüri and epithelial cell changes in minimal lesion glomerulopathy, *Nephron* 1976; 16: 310-317.
11. Kriz W, Elger M, Nagata M, Kretzler M, Uiker S, Koen-Hagemann I, Tenschert S, Lemley KV. The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis, *Kidney Int*, 1994; 45, (Suppl 42), 64-72.
12. Gang NF, Mautner W. Studies on the mechanism of the onset of proteinüri in aminonucleoside nephrosis, *Lab Invest*, 1972; 27: 310-322.
13. Caulfield JP, Reid JJ, Farquhar MG. Alteration of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis, *Lab Invest*, 1976; 34: 43-55.
14. Wang Y, Bass PS, Evans B, Thomas JH, Davies DR. Glomerular epithelial cell endocytosis in puromycin-induced glomerulopathy, *Nephron* 1992; 62: 84-89.
15. Seefeldt T, Bohman SO, Gundersen HJG, Maunsbach AB, Petersen VP, Olsen S. Quantitative relationship between glomerular foot process width and proteinüri in glomerulonephritis, *Lab Invest*, 1981; 44: 541-554.
16. Rennke HG. How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage? *Kidney Int*, 1994; 45 (Suppl, 45): 58-63.
17. Budde K, Neumayer HH, Salant DJ, Cybulsky AV, Coleman DL, Sterzel RB. Glomerular epithelial cell products stimulate mesangial cell proliferation in culture, *Kidney Int* 1997; 52: 733-741.
18. Endlich K, Kriz W, Witzgall R. Update in podocyte biology, *Curr Opin Neph Hypert*, 2001; 10: 331-340.
19. Morioka Y, Koike H, Ikezum Y, Ito Y, Oyanagi, A, Gejyo F, Shimizu, F, Kawachi H. Podocytes injuries exacerbate mesangial proliferative glomerulonephritis, *Kidney Int* 2001; 60: 2192-2204.
20. Kerjaschki D. Disfunctions of cell biology mechanism of visceral epithelial cell (podocytes) in glomerular diseases, *Kidney Int*, 1994; 45: 300-313.
21. Kaplan LA, Pesce AI. Clinical chemistry methods of analysis; 1984; 1322-1323.
22. Shimojo H. Adaptation and distortion of podocytes in rat remnant kidney. *Pathol Int.* 1998; 48: 368-83.
23. Nagata M, Yamaguchi Y, Komatsu Y, Ito K. Mitosis and the presence of binucleate cells among glomerular podocytes in diseased human kidneys, *Nephron* 1995; 70: 68-71.
24. Petermann AT, Pippin J, Hiromura K et al. Mitotic cell cycle proteins increase in podocytes despite lack of proliferation. *Kidney Int* 2003; 63: 113-122.
25. Castellet JJ, Hoover RL, Harper PA, Karnovsky MJ. Heparin and glomerular epithelial cell-secreted heparinlike species inhibit mesangial-cell proliferation, *Am J Pathol* 1985; 120: 427-435.
26. Floege J, Johnson RJ, Alpers CE, Fatemi-Namie S, Richardson CA, Gordon K, Couser WG. Visceral glomerular epithelial cells can proliferate in vivo and synthesize platelet-derived growth factor B-chain, *Am J Pathol*, 1993; 142: 637-650.
27. Kriz W. The role of podocyte in the degeneration of a renal glomerulus, *Advances Nephrol* 1997; 27: 1-13.

28. Salant DJ. The structural biology of glomerular epithelial cells in proteinuric diseases, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3: 569-574.
 29. Shirato I, Sakai T, Kimura K, Tomino Y, Kriz W. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *Am J Pathol.* 1996; 148: 1283-96
 30. Caulfield JP, Farquhar MG. The permeability of glomerular capillaries to graded dextrans, Identification of the basement membrane as the primary filtration barrier, *J Cell Biol* 1974; 63: 883-903.
 31. Rydel JJ, Schwartz MM, Singh AK. Sequential localization of antibody to multiple regions of the glomerular capillary wall in passive Heymann nephritis, *Lab Invest* 1989; 60: 492-498.
 32. Tornroth T. The fate of subepithelial deposits in acute poststreptococcal glomerulonephritis, *Lab Invest* 1976; 35: 461-474.
 33. Bohrer MP, Bayliss C, Robertson CR, Brenner BM. Mechanisms of the puromycin-induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. *J Clin Invest*, 1977; 60: 152-161.
 34. Fujigaki Y, Nagase M, Hidaka S, Matsui K, Shirai M, Nosaka H, Kawachi H, Shimizu F, Hishida A. Altered anionic GBM components in monoclonal antibody against slit diaphragm-injected proteinuric rats, *Kidney Int* 1998; 54: 1491-1500.
 35. Levidiotis V, Kanellis J, Lerino F.L., Power D.A. Increased expression of heparanase in puromycin aminonucleoside nephrosis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 532 A.
 36. Barbey MM, Fels LM, Soose M. Adriamycin affects glomerular renal function: Evidence for the involvement of oxygen radicals, *Free Radic Res Commun* 1989; 7: 195-203.
 37. Neale TJ, Ullrich R, Ojha P. Reactive oxygen species and neutrophil respiratory burst cytochrome b558 are produced by kidney glomerular cells in passive Heymann nephritis, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3645-3649.
 38. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* 2001; 59: 1003-1012.
 39. Shimizu J, Tanaka H, Aya K, et al. A missense mutation in the nephrin gene impairs membrane targeting. *Am J Kidney Dis* 2002; 40: 697-703
 40. Luimula P, Sandstrom N, Novikov D, et al. Podocyte associated molecules in puromycin aminonucleoside nephrosis of the rat. *Lab Invest*, 2002; 82: 713-718.
 41. Caulfield JP, Farquhar MG. The permeability of glomerular capillaries of aminonucleoside nephrotic rats to graded dextrans, *J Exp Med* 1975; 142: 61-72.
 42. Miller F, Palade GE. Lytic activities in renal protein absorption droplets, An electron microscopical cytochemical study, *J Cell Biol* 1964; 23: 519.
 43. Whiteside CI, Cameron R, Munk S, Levy J. Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol.* 1993; 142: 1641-53.
 44. Mundel P., Shankland SJ: Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 3005-3015.
 45. Kretzler M, Regulation of adhesive interaction between podocytes and glomerular basement membrane. *Microsc Res Tech.* 2002; 15; 57:247-53.
 46. Kim YH, Goyal M, Kurnit D, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, Kershaw D and Wiggins R: Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat, *Kidney Int.* 2001; 60: 957-968.
 47. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, Dijke P, Mundel P, Bottinger EP. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest* 2001; 108: 807-816.
 48. Ding G, Reddy K, Kapasi AA, Franki, Gibbons N, Kasinath BS, Singhal PC. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Renal Physiol* 2002; 283: F173-180.
 49. Samwal V, Pandya M, Bashkaran M, Franki N, Reddy H, Ding G, Kapasi A, Valderrama E, Singhal PC: Puromycin aminonucleoside induces glomerular epithelial cell apoptosis. *Expt Mol Path* 2001; 70: 54-64
 50. Lemley KV, Lafayette RA, Safai Met al. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2002; 61: 1475-1485.
 51. Whits KE, Bilous RW, Marshall SM, et al. Podocyte number in normotensive type 1 diabetes patients with albuminuria. *Diabetes* 2002; 51: 3083-3089.
- “Bu Çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir.” (1707 / 15082001 sayılı proje).