

DeneySEL Kronik Nefroz Modeli Sıçan Glomerüllerinde TGF-β1 Ekspresyonu ve Mezangiyal Değişiklikler

Ismail Seçkin¹ , Mümin Uzunalan¹ , Meltem Ayaz Pekpak² , Sibel Köktürk³ , Hüseyin Avni Sönmez⁴ , Zeynep Banu Güngör⁴ , Elif Yaprak Saraç⁵ , Aslı Emincik¹ , Sibel Demirci Delipınar¹ 

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Nefroloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

⁴İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁵İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Seçkin İ, Uzunalan M, Ayaz Pekpak M, Köktürk S, Sönmez HA, Güngör ZB. TGF-β1 expression and mesangial alterations in rat glomeruli of an experimental chronic nephrosis model. *Cerrahpaşa Med J* 2019; 43(1): 6-12.

Öz

Amaç: Puromisin aminonükleozid nefroz (PAN), proteinüri ile seyreden podosit yaralanması modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. DeneySEL olarak uyarılmış PAN hayvan modellerinde, minimal değişikliklere sahip insan nefrotik sendromu ve fokal segmental glomerulosklerozdakine benzer histolojik değişiklikler gösterilmiş, ancak etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmalar, çoğu kronik böbrek hasarlarında, ekstrasellüler matriks (ESM) birikiminin görüldüğü ve bu süreçte transforming büyüme faktörü-β1 (TGF-β1)'in anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada biz, kronik PAN uyarılı sıçan böbrek glomerüllerinde, TGF-β1 ekspresyonu ve mezangial matriks (MM) birikimi arasındaki ilişkiyi, böbrek fonksiyonu ve ultrastrüktürel değişikliklerle incelemeyi amaçladık.

Yöntemler: Bu çalışma için 12 erkek Wistar albino sıçan iki gruba ayrıldı: kontrol grubu ve kronik grup (n=6). Bütün veriler istatistiksel olarak One-way ANOVA testi ile analiz edildi.

Bulgular: Proteinüri seviyeleri kronik nefroz grubunda kontrolden yüksek (p<0,0025), serum albümin ve kreatinin klirens değerleri ise oldukça düşüktü (p<0,05). PAN nefrozlu sıçanların glomerüllerinde, hem TGF-β1 ekspresyonu hem de MM birikimi belirgin şekilde artmıştı. Kronik PAN grubunun glomerüllerinin ultrastrüktürel görüntülerinde artmış MM içerisinde apoptotik endotel ve mezangial hücrelere, interstisyel kollajene ve makrofajlara rastladık.

Sonuç: Bulgularımız, kronik PAN uygulamasının böbrek fonksiyonlarında bozulma ile birlikte, glomerülde TGF-β1 ekspresyonu, MM artışına, interstisyel kollajen oluşumuna ve makrofajların göçüne neden olan bir nefrotik sendromu indüklediğini düşündürmektedir. Bu çalışma, ikili işaretlemelerle TGF-β1'in ana kaynağının ve TGF-β1 sinyal yollarının belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duymaktadır.

Anahtar Sözcükler: Mezangial matriks, puromisin aminonükleozid nefroz, TGF-β1, ultrastrüktür

Cerrahpaşa Tıp Derg 2019; 43(1): 6-12

TGF-β1 expression and mesangial alterations in rat glomeruli of an experimental chronic nephrosis model

Abstract

Objective: Puromycine aminonucleoside nephrosis (PAN) is extensively used as an experimental model of proteinuria following podocyte injury. In PAN animal models, nephrotic syndrome with minimal change disease and focal segmental sclerosis-like nephritis is demonstrated to be similar to that in human; however, the real mechanism of PAN is not yet elucidated. Evidence shows that transforming growth factor-β1 (TGF-β1) plays a key via stimulating matrix protein synthesis of both glomerular epithelial and mesangial cells. In this study, we aimed to examine the relationship between TGF-β expression and accumulation in mesangial matrix (MM) by the changes in renal function and ultrastructure alterations in renal glomeruli of the chronic PAN induced rats.

Methods: Twelve male Wistar albino rats were divided into two groups: control group (n=6), chronic group (n=6). All data was statistically analyzed by One-way ANOVA Test.

Results: Proteinuria levels in the chronic nephrosis groups were greater than the control (p<0.0025) whereas the levels of serum albumin and creatinine clearances were progressively decreased (p<0.05). TGF-β1 expression and MM were both significantly increased in PAN

Geliş Tarihi/Received: 28 Kasım 2017 **Kabul Tarihi/Accepted:** 17 Mayıs 2019

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: İsmail Seçkin;

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

E-posta/E-mail: isseckin@istanbul.edu.tr

DOI: 10.26650/cjm.2019.43.11



group. Ultrastructural images of glomeruli of PAN showed apoptotic endothelium and mesangial cells, interstitial collagen and macrophages in increased MM.

Conclusion: Our findings suggest that chronic PAN application induces a nephrotic syndrome, leading to renal impairment by TGF- β 1 expression in glomeruli, increase in MM, formation of abundant interstitial collagen, and migration of macrophages. We suggest that chronic PAN progressively increases TGF- β 1 expression and apoptosis following expansion of mesangial matrix in the affected glomeruli. This study needs further researches to determine the main source and signal pathway of TGF- β 1 expression by double staining methods.

Keywords: Mesangial matrix, puromycine aminonucleoside nephritis, TGF- β 1, ultrastructure

Cerrahpaşa Med J 2019; 43(1): 6-12

Deneysel olarak uyarılmış Puromisin aminonükleozid nefroz (PAN) hayvan modellerinde, masif proteinüri ile seyreden ve glomerüllerde, minimal değişikliklere sahip insan nefrotik sendromu ile daha ileri dönemlerde, süreye bağlı olarak gelişen fokal segmental glomerülosklerozdakine benzer histolojik değişiklikler gösterilmiş, ancak PAN'ın etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır [1, 2].

In vivo [3] ve *in vitro* [4] çalışmalarda da podositlerin glomeruler kapillerlerin selektif permeabilitesini sağlamak ile alakalı olduğu ve podosit ayaklarının kaynaşması/çekilmesi neticesi slitpore sayısındaki azalmanın ve onun haraplanması neticesi oluşmuş soyulmuş glomeruler bazal membran (GBM) bölgelerinin artan proteinüriden sorumlu olduğu desteklenmiştir [5-7].

Yapılan çalışmalar çoğu kronik böbrek hasarlarında, glomeruler hücreler ve makrofajların mezangiyal hücrelerin (MH) çoğalmasını ve ekstrasellüler matriksin (ESM) birikmesini tetikleyen MH büyüme faktörlerini salgıladığını göstermiştir [8, 9]. Bu süreçte etkili olan faktörlerden biri, renal hastalıkların ana profibrogenik büyüme faktörü olan transforming büyüme faktörü- β 1'dir (TGF- β 1) [3, 10]. TGF- β 1 ayrıca hücre göçü, proliferasyonu, farklılaşması, hipertrofi ve apoptoz gibi olaylarla da ilişkilidir [4]. Hem glomeruler epitelial hem de mezangiyal hücrelerde TGF- β 1'in matriks proteinlerinin sentezini uyarması, glomerülosklerozda anahtar bir rol oynadığının göstergesidir.

Biz de bu çalışmada, kronik PAN uyarılı sıçan böbrek glomerüllerinde, glomeruler fonksiyon, morfoloji ve TGF- β 1 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntemler

Hayvan çalışmaları

Çalışmada 90-120 gr ağırlığında 12 adet erkek Wistar Albino sıçan (İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma laboratuvarı) ayrı kafeslerde ısı ve nem kontrollü odalarda 12 saatlik gündüz/gece siklusunda tutuldu. Standart sıçan besiniyle ve serbest şekilde ulaşabildikleri çeşme suyu ile beslendi.

Deney hayvanları kontrol ve kronik PAN olarak iki gruba ayrıldı (n=6). Kronik gruba, Marinides ve ark.'nın

[5] kronik PAN modeline uygun olarak, %0,09'luk izotonik sodyum klorürde çözündürülmüş 1,67 mg puromisin aminonükleozid (PA)/100 g (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA) subkutanöz olarak ilk üç hafta, haftada bir enjeksiyon; sonraki haftalarda iki haftada bir enjeksiyon olmak üzere 12 hafta uygulandı. Hayvanların 1., 3., 5., 6. ve 7. enjeksiyonları sonrasında 24 saatlik idrarları günlük olarak toplandı. Deney sonunda da eter anestezisi altında kan örnekleri alınan sıçanlar İstanbul Üniversitesi hayvan etik kurulunun kurallarına göre sakrifiye edildi ve sol böbrek dış korteks parçaları çıkarıldı.

Biyokimyasal analizler

Her sıçanın günlük idrar örneklerinden TCA yöntemi ile proteinüri ölçümü yapıldı [11]. Alınan kan örneklerinde serum albumin [BCG metodu [12]] ve kreatinin klirensi [Jaffe metodu [12]] ölçümü yapıldı. Serum albumin seviyeleri klinik kimya analizi ve kiti kullanılarak ölçüldü (Architect C8000, Abbott, Illinois, USA). Bütün hayvanlar deney başlangıcında ve deney sonunda tartıldı.

Işık mikroskopik analizler

Nekropsiden sonra sol böbrek korteksi dokularının yarısı %10 nötral formol ile fikse edildi ve ışık mikroskopi (IM) için 5 μ m kalınlığında parafin kesitler şeklinde hazırlandı. Rutin IM takibinden sonra, PAS + Hemalum uygulandı ve glomerül mezangiyal matriks oranları semi-kuantitatif olarak değerlendirildi [6]. Ayrıca immünohistokimyasal incelemeler için kesitlere TGF- β 1 antikorunu içeren ImmunoCruz TM Boyama Sistemi (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA), 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) kromojen-substrat, hematoksilin zıt boyamaları uygulandı ve semi-kuantitatif olarak değerlendirildi. Negatif kontrol için primer antikor uygulaması dışındaki tüm prosedürler aynı şekilde birer preparata uygulandı [7].

Mezangiyal matriks değerlendirmesi Raji ve ark.'nın yöntemine göre yapıldı [6]. PAS+Hemalum kesitleri mikroskop altında (Olympus BX 61 mikroskobu, Olympus DP 72 kamera sistemi ataçmanlı) 100x büyütmede her kesitte rastgele 20 glomerulus sayılarak değerlendirildi. Skorlar iki araştırmacı tarafından kör olarak mesangial matrix sahaları "0 ile +4" değerlendirildi.

Tablo 1. Kontrol ve Kronik Faz Gruplarında PAN enjeksiyonları (enj) öncesi ve sonrası protein değerleri (mg / 24 saat)

Proteinüri	Kontrol	1. enj	3. enj	5. enj*	6. enj	7. enj
Ortalama±Standart Sapma	4,87±3	5,18±2,2	34,39±7,6	40,96±12,7	184,23±81,5	247,5±90

*Proteinüri 5. enjeksiyonundan sonra arttı

Tablo 2. Kontrol ve Kronik Faz Gruplarının deneyin başlangıcında (Baş.) ve sonundaki biyokimyasal verileri

		Proteinüri (mg/24 sa)	Serum Albumin (g/dL)	Kreatinin Klirens (mL/dak)	Ağırlık (g)	İdrar Hacmi (cc/24 sa)
Kontrol	Baş.	3,12±2,4	3,23±0,1	0,55±0,8	105±13,78	7,2±2,1
	Son	4,87±3			140±15,49	11,5±2,3
Kronik	Baş.	5,18±2,2	2,35±0,38**	0,29±0,1**	100±8,94	7±3,2
	Son	247,50±90*			210±24,49**	9±4,8**

Tüm veriler ortalama±SS (medyan) olarak verildi

*p<0,0025

**p<0,05

ri arasında derecelendirildi. Daha sonra [(skor x aynı skordaki glomerül sayısı/20)+ (skor x aynı skordaki glomerül sayısı/20)+(.....)x100=1 sıçandaki MM oranı] formülü ile deney gruplarındaki mezangiyal matris oranları hesaplandı.

İmmunohistokimyasal değerlendirmeler de değiştirilmiş H-SCORE analizi ile her kesit için iki gözlemci ile kör olarak rastgele seçilen yirmi glomerulide semi-kantitatif olarak yapıldı. Reaktivite skorları 0-300 arasında olmak üzere yoğunluk kategorilerine ayrıldı: 0: Yok, 0-75: Zayıf reaksiyon fakat kontrole kıyasla kaydedilebilir, 75-150 (belirgin), 150-225: yoğun ve 225-300: çok yoğun. Her hayvan için ortalama bir skor belirlendi [12].

Elektron mikroskopik analizler

Korteksin ikinci yarısından alınan dokular transmisyon elektron mikroskopi (TEM) incelemeleri için uygun tekniklerle hazırlandı [12]. Zeiss EM 9 S2 elektron mikroskobunda incelenen parçaların ayrıca x6000 büyütmede morfometrik değerlendirilmeleri yapıldı. Morfometrik incelemeler için Powell metodu [13] biraz değiştirilerek periferik bölgelerden x6000 büyütmede çekilen elektron mikrograflarda 6 cm'lik perikapiller GBM sahasında slit-pore sayımı yapıldı.

İstatistiksel analizler

İki grubun proteinüri, serum albümin, kreatin klirens ve ağırlıkları ve immunohistokimyasal değerleri the Kolmogorov-Smirnov testine göre normal dağılımda oldukları için One-Way ANOVA testleri ve post hoc Holm-Sidak testi ile değerlendirildi. PAS boyanmasının H-SCORE değerleri ise Kruskal-Wallis One-Way ANOVA

VA ve takibinde Student-Newman-Keuls testleri ile değerlendirildi. İstatistiksel analizler GraphPad InStat statistic programında yapıldı. p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.

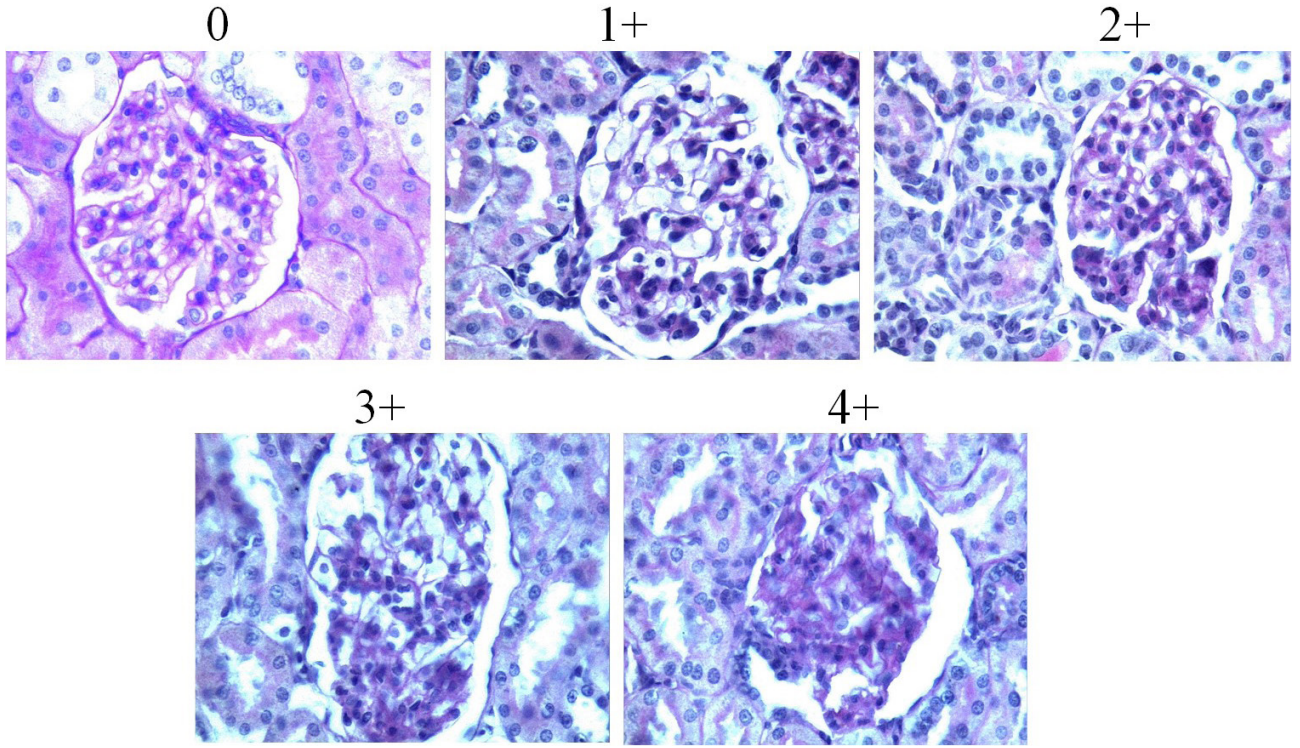
Bulgular

Biyokimyasal bulgular

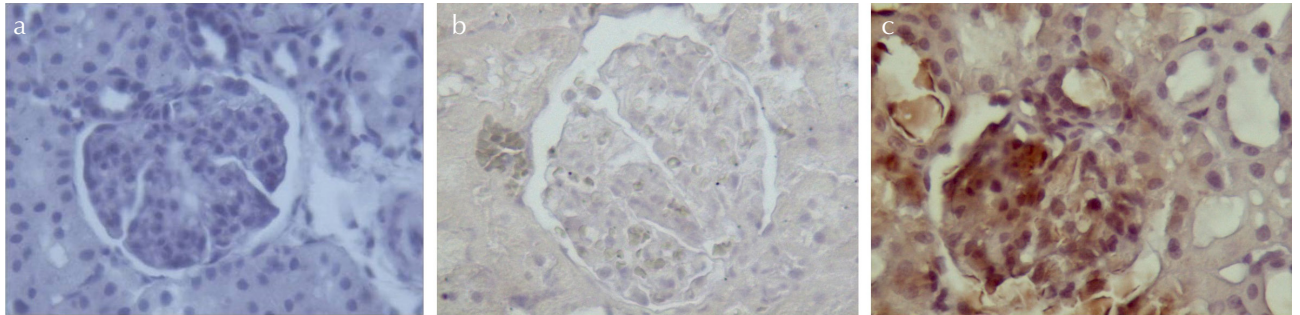
Kontrol grubu sıçanlarda ortalama proteinüri değerinin 4,87±3 mg/24 saat olduğunu ve kronik PAN sıçanlarında enjeksiyon öncesinde ortalama proteinüri değerinin kontrol grubuna yakın olarak 5,18±2,2 olduğunu gösterdi. Kronik PAN grubunda 12. haftada 7. PAN enjeksiyonu sonrasında proteinüri değerleri ortalaması başlangıç değerlerine kıyasla anlamlı olarak yaklaşık 50 kat artarak 247,5±90 mg/24 saate yükselmişti (Tablo 1). Kronik sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla proteinüri değerleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiş (p<0,0025) (Tablo 1), buna karşın serum albumin ve kreatinin klirensi azalmıştı. (p<0,05) (Tablo 2). Kontrol grubunun serum albumin değerleri ortalaması 3,23±0,1 g/dL iken kronik grubun değerleri 2,35±0,38 g/dL olarak hesaplandı. Kreatinin klirensi ortalaması ise kontrol grubunda 0,55±0,8 mL/dak iken kronik grupta 0,29±0,1 mL/dak. ya düşmüştü (Tablo 2).

Kontrol grubundaki hayvanların ortalama ağırlıkları, başlangıçta 100±17,8 g iken deney süresinin sonunda 140±15,49 g'a yükselirken; kronik grubun ortalaması, başlangıçta 100±8,94 iken anlamlı derecede artarak 210±24,49 g'a yükselmişti (p<0,05) (Tablo 2).

24 saatlik ortalama idrar volümleri karşılaştırıldığında kontrol grubunda başlangıçta 7,2±2,1 cc iken de-



Şekil 1. Kronik PAN grubunun böbrek cisimciğindeki semi-kantitatif değerlendirmeleri (0 ila +4 arasında) gösteren ışık mikroskopik fotoğraflar, PAS+Hemalum, X40



Şekil 2. a-c. Kontrol ve deney gruplarının glomerüllerinde TGF-β1 antikorunun immünoreaktivitesi. Negatif kontrol (a), Kontrol grubu (b), Kronik PAN grubu, X40 (c)

Tablo 3. Kontrol ve kronik faz gruplarının semi-kantitatif mezangiyal matriks oranları ve TGF-β1 immünoreaktivitesi

	Mezangiyal Matriks Oranı	TGF-β1 Reaktivitesi
Kontrol	13,33±4,08	0
Kronik	154,66±44,21*	250,6±25,7

Tüm veriler ortalama±SS (medyan) olarak verildi
*p<0,05

ney süresi sonunda $11,5 \pm 2,3$ cc'e yükselirken, deney grubunun ortalaması başlangıçta $7 \pm 3,2$ cc iken deney süresi sonunda $9 \pm 4,8$ cc 'e anlamlı derecede yükselmişti ($p < 0,05$) (Tablo 2).

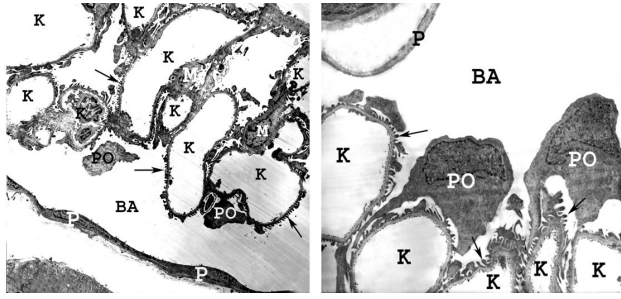
Işık mikroskopik bulgular

Deney gruplarının PAS+Hemalum ile boyanan preparatlarında semi-kantitatif olarak hesaplanan böbrek cisimciğindeki ortalama MM oranı, kronik grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmişti ($p < 0,05$) (Tablo 3) (Şekil 1).

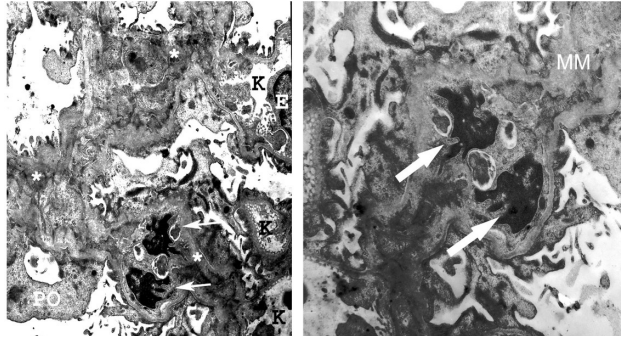
Immunohistokimyasal analiz sonucu TGF-β1 immünoreaktivitesi kontrol sıçanlarında görülmez iken kronik sıçanlarda H-SCORE ortalaması $250,6 \pm 25,7$ olarak hesaplandı (Tablo 3) (Şekil 2).

Elektron mikroskopik bulgular

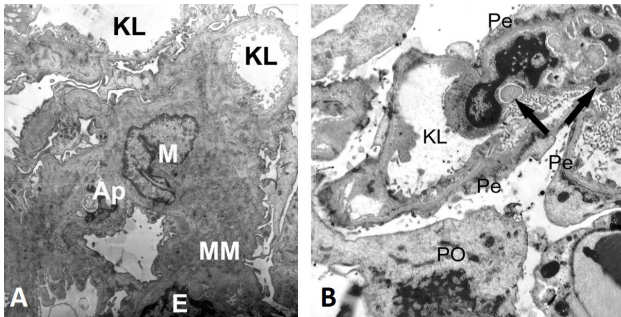
Kontrol grubu sıçanların böbrek cisimciklerinin ultrastruktürü normal izlendi (Şekil 3). Kronik PAN sıçanlarının elektron mikrograflarında kontrol grubuna nazaran



Şekil 3. Kontrol grubunda böbrek cisimciğinden bir bölgenin TEM görüntüsü. Bowman Aralığı (BA), Paryetal Yaprak (P), Podosit (PO), Kapiller lümeni (K), Mezangiyal Hücre (M), X1450 (A), X3500 (B)

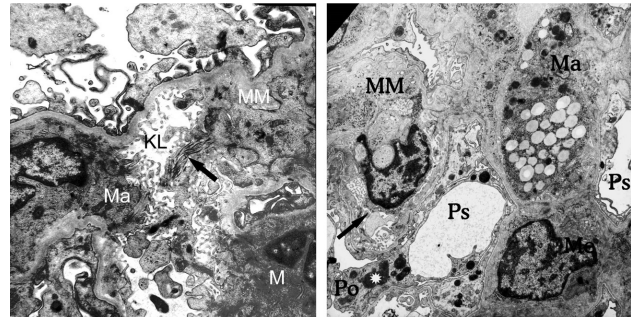


Şekil 4. Kronik PAN grubunda böbrek cisimciğinden bir bölgenin TEM görüntüsü. Kronik grupta böbrek cisimciğinde mezangiyal matriks artışı (*), bu sahaya yerleşmiş apoptotik mezangiyal hücreler (ok) ve elektron yoğun depozitleri (kırmızı yıldız) gösteren bir bölge. Kapiller lümeni (K), Dejeneratif podosit (PO), Endotel (E), X3500 (A) ve X14500 (B)



Şekil 5. Kronik PAN grubunda böbrek cisimciğinde mezangiyal matriks artışı (MM) ve bu sahaya yerleşmiş apoptotik mezangiyal hücreyi (Ap) gösteren bir bölge X3500 (A) ile böbrek cisimciğinde apoptotik endotel hücresi (ok) X14500 (B) Kapiller lümeni (KL), Apoptotik mezangiyal hücre (M), Endotel (E), Pedisel (Pe), Podosit (PO)

artmış MM alanları (Şekil 4, Şekil 5A) ve bunların içinde apoptotik görüntüler gösteren mezangiyal (Şekil 4, Şekil 5A) ve endotel hücreleri (Şekil 5B) ile yer yer interstisyel kollajen birikimlerine (Şekil 6A) ve bu sahalarla yakın bazıları 'foam cell' tipindeki (Şekil 6A) makrofajlara (Şekil 6B) sıklıkla rastlandı. Genellikle paramezangiyal sahalarda da elektron yoğun depozitler gözlemlendi (Şekil 4B).



Şekil 6. Kronik PAN grupta mezangiyal matrix (MM) içinde interstisyel kollajen (ok) içeren bir bölge X14500 (A) ile böbrek cisimciğinde fazlaca mezangiyal matriks artışı (MM) ve bu sahaya yerleşmiş 'foam-cell' tipindeki makrofaj (Ma) X14500 (B)

Makrofaj (Ma), Mezangiyal hücre (M), Kapiller Lümeni (KL), Podosit (Po), Protein absorpsiyon granülleri (*)

Tartışma

Önceki deneysel olarak uyarılmış PAN hayvan modeli çalışmamızda, akut ve kronik gruplarımızın podosit dejenerasyonlarını yayınlamıştık [12]. Bu çalışmamızda ise kronik PAN nefrozda glomerülde TGF- β 1 ekspresyonunu ve mezangiyumu inceledik. Yapılan yakın çalışmalarda, çoğu kronik böbrek hasarlarında, glomerüler hücrelerin (podositler, MH, endotel) ve makrofajların aktivasyonunun, MH çoğalmasıyla birlikte MM birikmesini tetikleyen MH büyüme faktörlerini salgıladığı [8, 9] ve böylelikle özellikle kollajen sentezini tetikleyerek glomerüloskleroz işlemine direkt katkıda bulunabileceği gösterilmiştir [14]. Bu süreçte etkili olan faktörlerden biri, renal hastalıkların ana profibrogenik büyüme faktörü olan TGF- β 1'dir [3, 10]. Böbrekte MH ve makrofajların TGF- β 1'i salgıladığı bilinmektedir [15]. TGF- β 1, renal interstisyel fibrozisde birincil sitokindir [16]. TGF- β 1'in aşırı üretimi; kollajenler, fibronektin ve proteoglikanlar gibi matriks proteinlerinin, proteaz inhibitörlerinin ve lokal matriks depozisyonunu arttıran integrin denenen hücre matriks reseptörlerinin sentezinin artmasını etkileyerek matriks birikimine ve doku fibrozuna yol açar [17]. TGF- β 1'in matriksteki mezangiyal hücreleri ile makrofajların profibrotik etkilerini düzenlediği ve makrofajlardan türemiş faktörlerin proskleratik cevaplarının bir kısmını arttırdığı gösterilmiştir [18]. Yükselmiş TGF- β 1 seviyeleri ile glomerülofrit, glomerüloskleroz ve tübüler hipertrofi arasında sıkı bir ilişki saptanmıştır [19]. Bunlara paralel olarak TGF- β 1 inhibisyonunun da glomerülofritis olgularında matriks gelişmesini engellediği, deneysel modellerde gösterilmiştir [20].

Yaptığımız semi-kuantitatif çalışmada, kronik grupta TGF- β 1 ve MM oranının anlamlı artışı bize, yukarıdaki kaynakları destekler şekilde, glomerüler hücrelerin herhangi birinden salgılanan TGF- β 1'in

parakrin ya da otokrin bir etki ile bu hücrelerden bir kaçını etkileyerek, MM artışını tetikleyebileceğini düşündürdü.

Yapılan çalışmalarda da podositler tarafından TGF- β 1 uyarısıyla sekresyonu yapılan bağ dokusu ve vasküler endotelial büyüme faktörlerinin, glomerüloskleroz gelişimi süresince, MH üzerinde MM birikiminin parakrin düzenleyicileri olarak etki ettiği ve böylelikle kronik glomerüler hastalıklarda, TGF- β 1 uyarılı MM sentezinde MH'lerin rollerinin anlaşılmasında bu verilerin katkı sağlayacağı desteklenmiştir [21].

TGF- β 1; hücre göçü, proliferasyonu, farklılaşması, hipertrofisi yanında çeşitli sinyal yolları ile hücre apoptozu gibi olaylarla da ilişkilidir [4, 22]. Biz de çalışmamızda, kronik PAN grubunda, MM sahalarında sıklıkla apoptotik mezangiyal hücrelere ve bazıları "foam-cell" (köpüksü hücre) tipindeki makrofajlara rastladık. Yapılan çalışmalarda da hastalık ilerlemesiyle birlikte glomerülde artan MH apoptozu gözlenmiştir [9]. MH apoptozunun, glomerüler hücre proliferasyonunun büyüklüğünü kontrol eden fazlaca çoğalmış istenmeyen MH'leri temizleyen, hücre miktarının homeostazının sürdürülmesini sağlayan bir mekanizma olduğu ve normal MM'in, MH'ler için yaşamsal faktör olarak hizmet ederek MH apoptozunu önlediği belirtilmiştir [14]. Hastalık durumlarında, sadece artan MM bileşenlerinin değil, özellikle normal glomerülde bulunmayan interstisyel kollajenin de (Tip I, III) apoptotik indüksiyonda etkili olabileceği düşünülmüştür [4, 23].

Çalışmamızda interstisyel kollajen olarak değerlendirdiğimiz kollajen lif kesitlerini TEM'de gözledik. Bunu da glomerüler hasardan sonra MH'lerin, kendi fenotipik değişiklikleri ile çeşitli interstisyel kollajenleri üretebilmelerine bağlayabiliriz [4, 23].

Bir kısım araştırmacı MH apoptozunun moleküler mekanizmasındaki pro-apoptotik yaşamsal faktörler olan MH proliferasyonunun ve MM artışının düzenleyicisi olarak TGF- β 'ya bir rol yüklemişler [24] ve MH apoptozunun mezangiyoproliferatif glomerülonefrit'in çözümünde [7] ve glomerüloskleroz ilerlemesinde [25] önemli olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim de gözlediğimiz TGF- β 1, MM ve MH apoptozu artışı bulgularımız bu düşünceleri desteklemektedir. Ancak bu olayda hangi sinyal yollarının kullanıldığı ile ilgili, daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Neticelerimiz kronik PAN uygulanmasının böbrek cisimciğinde bozulan renal fonksiyon ile ilişkili MM artışı, interstisyel kollajen belirginleşmesi, MH ve endotel hücre apoptozu, makrofajların göçü ve artmış TGF- β 1 ekspresyonu bulgularıyla birlikte seyreden bir nefrotik sendromu indüklediğini düşündürmektedir. Ancak ikili işaretlemelerle TGF- β 1'in ana kaynağının ve TGF- β 1 sinyal yollarının belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duymaktadır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Hasta Onamı: N/A.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - İ.S., M.A.P.; Tasarım - İ.S., M.U.; Denetleme - İ.S., M.A.P., S.K.; Kaynaklar - İ.S., M.U., S.K.; Malzemeler - İ.S., M.U., S.K.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - H.A.S., Z.B.G., E.Y.S., A.E., S.D.D.; Analiz ve/veya Yorum - İ.S., E.Y.S., A.E., S.D.D.; Literatür Taraması - İ.S., E.Y.S., A.E., S.D.D.; Yazıyı Yazan - İ.S., E.Y.S., A.E., S.D.D.; Eleştirel İnceleme - İ.S., M.A.P., H.A.S., Z.B.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 1707/15082001).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Ethics Committee of İstanbul University.

Informed Consent: N/A.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - İ.S., M.A.P.; Design - İ.S., M.U.; Supervision - İ.S., M.A.P., S.K.; Resources - İ.S., M.U., S.K.; Materials - İ.S., M.U., S.K.; Data Collection and/or Processing - H.A.S., Z.B.G., E.Y.S., A.E., S.D.D.; Analysis and/or Interpretation - İ.S., E.Y.S., A.E., S.D.D.; Literature Search - İ.S., E.Y.S., A.E., S.D.D.; Writing Manuscript - İ.S., E.Y.S., A.E., S.D.D.; Critical Review - İ.S., M.A.P., H.A.S., Z.B.G.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: This work was supported by Scientific Research Project Coordination Unit of İstanbul University (Project Number: 1707/15082001).

Kaynaklar

1. Krishnamurti U, Zhou B, Fan WW, Tsilibary E, Wayner E, Kim Y, et al. Puromycin aminonucleoside suppresses integrin expression in cultured glomerular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 758-66.
2. Sanwal V, Pandya M, Bhaskaran M, Franki N, Reddy K, et al. Puromycin aminonucleoside induces glomerular epithelial cell apoptosis. *Exp Mol Pathol* 2001; 70: 54-64. [CrossRef]
3. Savill J, Mooney A, Hughes J. Apoptosis and renal scarring. *Kidney Int Suppl* 1996; 54: S14-7.
4. Makino H, Shikata K, Wieslander J, Wada J, Kashihara N, Yoshioka K, et al. Localization of fibril/microfibril and basement membrane collagens in diabetic glomerulosclerosis in type 2 diabetes. *Diabet Med* 1994; 11: 304-11. [CrossRef]

5. Marinides GN, Groggel GC, Cohen AH, Border WA. Enalapril and low protein reverse chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *Kidney Int* 1990; 37: 749-57. [\[CrossRef\]](#)
6. Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 1984; 26: 137-43. [\[CrossRef\]](#)
7. Hill C, Flyvbjerg A, Grønbaek H, Petrik J, Hill DJ, Thomas CR, et al. The renal expression of transforming growth factor- β isoforms and their receptors in acute and chronic experimental diabetes in rats. *Endocrinology* 2000; 141: 1196-208. [\[CrossRef\]](#)
8. Kihara I, Yaoita E, Yamamoto T. Cellular processes of glomerular adhesion in aged rats. *Acta Medica et Biologica* 1990; 38: 69-80.
9. Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1995; 47: 114-21. [\[CrossRef\]](#)
10. Morioka Y, Koike H, Ikezumi Y, Ito Y, Oyanagi A, Gejyo F, et al. Podocyte injuries exacerbate mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 2001; 60: 2192-204. [\[CrossRef\]](#)
11. Kaplan L. *Pesce AI Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation*. St. Louis, Mo: CV Mosby Co, 1984. 1231.
12. Seckin I, Uzunalan M, Pekpak M, Kokturk S, Sonmez H, Oztürk Z, et al. Experimentally induced puromycine aminonucleoside nephrosis (PAN) in rats: evaluation of angiogenic protein platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) expression in glomeruli. *J Biomed Sci* 2012; 19: 24. [\[CrossRef\]](#)
13. Powell H. Relationship between proteinuria and epithelial cell changes in minimal lesion glomerulopathy. *Nephron* 1976; 16: 310-7. [\[CrossRef\]](#)
14. Davies M, Shewring L, Thomas G, Jenner L. Stimulation of proteoglycan (pg) synthesis in rat mesangial cells (rmc) in response to tumor necrosis factor (tnf). In *kidney international* 1989. [\[CrossRef\]](#)
15. Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E, Border WA. Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 1990; 86: 453-62. [\[CrossRef\]](#)
16. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-92. [\[CrossRef\]](#)
17. Lafayette RA, Mayer G, Park SK, Meyer TW. Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest* 1992; 90: 766-71. [\[CrossRef\]](#)
18. Pawluczky IZ, Harris KP, Harris, Transforming growth factor- β suppresses macrophage-induced mesangial cell fibronectin expression. *Kidney Int* 2001; 60: 533-42. [\[CrossRef\]](#)
19. Sharma R1, Khanna A, Sharma M, Savin VJ. Transforming growth factor- β 1 increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via hydroxyl radicals. *Kidney Int* 2000; 58: 131-6. [\[CrossRef\]](#)
20. Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, et al. Inhibition of TGF- β 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; 50: 148-55. [\[CrossRef\]](#)
21. Lee HS, Song CY. Differential role of mesangial cells and podocytes in TGF-beta-induced mesangial matrix synthesis in chronic glomerular disease. *Histol Histopathol* 2009; 24: 901-8.
22. Sandau K, Pfeilschifter J, Brüne B. Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int* 1997; 52: 378-86. [\[CrossRef\]](#)
23. Johnson R, Yamabe H, Chen YP, Campbell C, Gordon K, Baker P, et al. Glomerular epithelial cells secrete a glomerular basement membrane-degrading metalloproteinase. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2: 1388-97.
24. Johnson RJ, Lovett D. In vivo gene transfer, Koch's postulates, and renal disease. *J Clin Invest* 1993; 92: 2568. [\[CrossRef\]](#)
25. Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Apoptosis in progressive crescentic glomerulonephritis. *Lab Invest* 1996; 74: 941-51.