

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK NEFROLOJİSİ
BİLİM DALI

**FOKAL SEGMENTAL
GLOMERÜLOSKLEROZ MODELİNDE
DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLIL
HEPARİNLERİN HİSTOPATOLOJİK
SKORU
İYİLEŞTİRME ETKİSİ**

YANDAL UZMANLIK TEZİ

UZM. DR. NEVİN SEMERCİ KOYUN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ferah SÖNMEZ

AYDIN - 2009

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-08001
sayı ile desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

1. ÖNSÖZ ve TEŞEKÜR	
2. DİZİNLER	
3. GİRİŞ ve AMAÇ	1-2
4. GENEL BİLGİLER	3-26
NEFROTİK SENDROM	3-5
MİNİMAL LEZYON HASTALIĞI	5
FOKAL SEGMENTAL GLOMERÜLOSKLEROZ	6-9
FSGS HİSTOPATOLOJİSİ	9-12
FSGS PATOGENEZİ	12-17
FSGS TEDAVİSİ	17-21
FSGS PROGNOZU	21
HEPARİN ve TÜREVLERİ	22-23
DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNLER	24-25
ADRİYAMİSİNLE OLUŞTURULAN FSGS RAT MODELİ	25-26
5. GEREÇ ve YÖNTEM	27-34
6. BULGULAR	35-53
7. TARTIŞMA	54-64
8. SONUÇLAR	65
9. ÖZET	66-67
10. İNGİLİZCE ÖZET	68-69
11. KAYNAKLAR	70-82
12. EKLER	83-88

KISALTMALAR

ACE : Anjiotensin dönüştürücü enzim

ADR : Adriyamisin

DMAH : Düşük molekül ağırlıklı heparin

GBM: Glomerüler bazal membran

GFR : Glomerüler filtrasyon hızı

EGF : Epidermal büyüme faktörü

EM : Elektron mikroskopu

FGF : Fibrojenik büyüme faktörü

FSGS : Fokal segmental glomerüloskleroz

IM : Işık mikroskopu

ISKDC: Uluslararası çocukluk çağı böbrek hastalıkları grubu

İF : İmmünfloresan

MLH : Minimal lezyon hastalığı

NS : Nefrotik sendrom

PDGF : Platelet bağımlı büyüme faktörü

SBNS : Steroide bağımlı nefrotik sendrom

SDNS : Steroide dirençli nefrotik sendrom

SHNS : Steroide hassas nefrotik sendrom

TGF- β : Doku büyüme faktörü - beta

TND: Türk Nefroloji Derneği

VEGF : Damarsal büyüme faktörü

TABLO DİZİNİ

1. Tablo 1. FSGS nedenleri
2. Tablo 2. FSGS’de meydana gelen histopatolojik değişiklikler
3. Tablo 3. Grupların ağırlık değişimleri.
4. Tablo 4. Grupların zaman içindeki 24 saatlik idrar miktarları
5. Tablo 5. Grupların 24 saatlik sıvı alımları
6. Tablo 6. Grupların kan kreatinin düzeyleri
7. Tablo 7. Grupların kan üre düzeyleri
8. Tablo 8. Grupların serum protein değerleri
9. Tablo 9. Grupların serum albümin düzeyleri
10. Tablo 10. Grupların kan trigliserid düzeyleri
11. Tablo 11. Grupların kan total kolesterol değerleri
12. Tablo 12. Grupların kan sodyum değerleri
13. Tablo 13. Grupların günlere göre kan potasyumu
14. Tablo 14. Grupların kan kalsiyum değerleri
15. Tablo 15. Grupların zamana göre kan glüköz değerleri
16. Tablo 16. Zaman içinde idrar 24 saatlik protein değerleri
17. Tablo 17. Grupların 24 saatlik idrar protein değerleri
18. Tablo 18. Gruplara göre semikantitatif histopatolojik skörlama sonuçları

ŒEKİL DİZİNİ

1. Œekil 1. Glomerülün yapısı
2. Œekil 2. Glomerülosklerozda lezyon tipleri
3. Œekil 3. Heparin molekülünde yer alan sülfatlanmış Œeker birimleri
4. Œekil 4. Grupların zaman içindeki kan kreatinin değerleri
5. Œekil 5. Grupların zaman içinde idrar protein değerleri.

RESİM DİZİNİ

1. Resim 1. Hematoksilen eozin ile boyanan normal glomerül
2. Resim 2. Wistar albino cinsi rat.
3. Resim 3. Metabolik rat kafesi.

EKLER DİZİNİ

- 1. Ek 1. Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik onayı.**
- 2. Ek 2. Tüm grupların laboratuvar ve patoloji sonuçları**

GİRİŞ ve AMAÇ

Çocukluk çağında böbrek yetmezliği nedenleri arasında Türk Nefroloji Derneğinin 2007 yılı verilerine göre glomerülo nefritler %22,9 ile idrar yolu enfeksiyonu ile birlikte ilk sırada yer almaktadır.

Çocukluk çağı böbrek hastalıklarından en sık görülenlerden biri nefrotik sendromdur. Birincil nefrotik sendrom nedenleri arasında minimal lezyon hastalığı %76, fokal segmental glomeruloskleroz (FSGS) %9 sıklıkta görülmektedir. FSGS tedavisinde steroidlere yanıt düşüktür (%20), diğer tedavi seçenekleri pulse metil-prednisolon, siklofosfamid, siklosporin, azitiyoprin, ACE inhibitörleri, mikofenolat mofetil, takrolimus, plazmaferez ve immünoadsorbsiyondur. Bu tedaviler steroidler ile kombine veya tek başına verilmektedir. FSGS tedavi seçenekleri de yeterli değildir ve bu tedavilerin yan etkileri çocuklar için ağırdır. FSGS'lu olguların 10 yıl tedavilere rağmen sonunda yaklaşık %20'sinin böbrek yetmezliğine ilerlediği bildirilmektedir. Bu nedenle FSGS'un tedavisi için yan etkisi düşük, etkinliği yüksek tedavi seçeneklerinin bulunması önemlidir.

Düşük molekül ağırlıklı heparinlerin (DMAH), son yıllarda antitrombotik etkilerinin yanında, antiinflamatuvar, antiangiogenik, antilipemik ve antifibrotik etkileri nedeniyle, doku hasarında koruyucu özelliklerinin olduğunu gösteren araştırmalar vardır. İnsanlarda deltaparinin yara iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiş ve fibroblast çoğalmasını önlediği gösterilmiştir. Heparinlerin hayvan deneylerinde siklooksijenaz-2 ve nitrik oksid sentaz inhibisyonu ile lokal inflamatuvar mediatörlerinin sentezini, lökosit göçünü, IL-1 β ve TNF- α sentezini önlediği gösterilmiştir. Deneysel peritonit modelinde doku ödemi, nötrofil göçünü,

lökosit adhezyonunu ve transmigrasyonunu azalttıkları gösterilmiştir. Heparin ve heparan sulfatın fare akciğer alveollerinde fibroblast çoğalmasını azaltarak remodeling safhasını hafiflettikleri bulunmuştur. Böbrek patolojilerinde de düşük molekül ağırlıklı heparinler ile ödem, yangı, fibroblast çoğalmasının baskılandığı gösterilmiştir.

Adriyamin (ADR, doksurubisin) bir antineoplastik antibiyotiktir. Deneysel çalışmalarda ratlarda nefropati ve FSGS modeli oluşturmak için kullanılmaktadır.

Bu çalışmada amacımız deneysel olarak düşük molekül ağırlıklı heparinlerin, adriyaminle FSGS oluşturulan ratlarda, klinik ve histopatolojik olarak etkinliğini araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

Nefrotik Sendrom

Çocukluk çağı idrar yolu enfeksiyonlarının önlenmesi, tanı ve tedavisindeki etkili uygulamalar sonucunda böbrek yetmezliği nedenleri arasında ilk sıralara glomerulonefritler yerleşmektedir. Türk Nefroloji Derneğinin 2004 yılı verilerine göre birincil glomerulonefritler %20,7 oranı ile ikinci sıradayken, 2005 yılı verilerine göre %28.6 ile çocuklarda son dönem böbrek yetmezliği nedenleri arasında birinci sırada, 2007 yılında da %22,9 ile idrar yolu enfeksiyonu ile birlikte ilk sırada yer almaktadır (1).

Çocukluk çağı böbrek hastalıklarından en sık görülenlerden biri nefrotik sendromdur. Ödem, ağır proteinüri ($\geq 40\text{mg/m}^2/\text{saat}$ veya 50mg/kg/gün), hipoalbuminemi ($\leq 2,5\text{g/dl}$), hiperlipidemi kliniği ile karakterizedir. İlk olarak 2000 yıl önce tanımlanmıştır. 1484 yılında Roelans ve Zuinger nefrotik sendromlu çocukların böbrek yetmezliğine kadar ilerleyen süreçlerini tarif etmişlerdir. Nefrotik sendrom tedavisinde antibiyotiklerin ve immünosupresif ilaçların kullanımından önceki dönemde birçok hasta bu hastalıktan ve komplikasyonlarından kaybedilmiş, bir kısmı da spontan olarak ödemin rezolüsyonu ile kendiliğinden iyileşmiştir. Steroid döneminden önce NS'un mortalitesi %67 iken, 1950 yıllarında antibiyotiklerin ve steroidlerin bu hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlaması ile mortalitesi %9'a kadar gerilemiştir (2). Çocukluk çağında nefrotik sendrom birincil ve ikincil nedenler ile meydana gelmektedir.

Birincil nefrotik sendrom nedenleri (2):

- Minimal lezyon hastalığı (%76, biyopsi + klinik ile tanı)
- Fokal segmental glomeruloskleroz (%5-9)
- Membranöz glomerulonefritler (<%3)
- Membranoproliferatif glomerulonefritler (%2-8)
- Mezangial proliferatif glomerulonefritler (%2-5)
 - İgM nefropatisi
 - İgA nefropatisi
- Konjenital nefrotik sendrom (Fin tipi, podosin, nefrin, α -Aktinin4 ve diğer mutasyonlar)

İkincil nefrotik sendrom nedenleri (3,4):

- Henoch-Schönlein nefriti
- Sistemik lupus eritematozus
- Enfeksiyonlar (Hepatit B enfeksiyonu, sifiliz (konjenital), ventriküloatrial şant enfeksiyonları, subakut bakterial endokardit, sıtma, suçiçeği, toksoplazmozis, CMV, kızamıkçık, HIV)
- Kronik enflamatuvar hastalıklar (Ailesel Akdeniz ateşi, amiloidoz)
- Neoplazmalar (lenfomalar, lösemi)
- Herediter hastalıklar (Alport sendromu)
- İlaçlar (altın tuzları, D- penisilamin, eroin, non-steroid antienflamatuvar ilaçlar, civa)
- Allerjenler
- Orak hücreli anemi
- Diyabetes mellitustur.

Steroid tedavisine verdiği yanıtı göre:

Steroide duyarlı nefrotik sendrom (SHNS): Steroid tedavisi ile remisyona sağlanan ve steroid dozu azaltılması veya tedavi kesilmesi ile atak olmayanlar.

Steroide bağımlı nefrotik sendrom (SBNS): Doz azaltma veya steroidin kesilmesi ile 14 gün içinde atak gelişenler.

Steroide dirençli nefrotik sendrom (SDNS): Tam doz steroid tedavisi ile 4- 8 hafta sonunda remisyona sağlanamamış olanlardır. Tüm çocukluk çağı NS'ları içinde %10 civarındadırlar ve bu olguların da %40'ı yaklaşık 5 yıllık bir sürenin sonunda son dönem böbrek yetmezliğine ilerlemektedir. Steroide dirençli olguların yaklaşık yarısı fokal segmental glomerulosklerozdur.

Remisyon: Üç gün üst üste proteinürinin 4mg/m²/saat ve altında saptanmasıdır.

Atak: En az üç gün üst üste proteinürinin 40mg/m²/saat ve üzerinde olmasıdır.

Sık atak: 12 ayda dört ve üzeri, altı ayda iki ve üzerinde atak olmasıdır.

Minimal Lezyon Hastalığı

Bu gruptaki olguların yaşları genellikle 2-7 arasındadır ve yaklaşık %80 steroid tedavisine cevap vermektedir. Etiyolojisinde hücrel ve humoral sistemdeki bozukluklar suçlanmaktadır. Işık mikroskopunda glomerüller normal görülmektedir, ultrastruktürel değişiklikler podositler ve mezangial bölgededir. Podositlerin ayakları çıkıntılarındaki yapışıklıklar ve mezangial matrikste artış bu hastalıkta saptanan histopatolojik değişikliklerdir. Klinik olarak iyi seyirlidir, böbrek fonksiyonlarında bozulma, hematüri, hipertansiyon eşlik etmemektedir (5,6).

Fokal Segmental Glomeruloskleroz

Uluslararası çocukluk çağı böbrek hastalıkları grubunun (ISKDC) yaptığı çok merkezli araştırmaya göre nefrotik sendromlu olguların kafkas ırkında %18'inde, Afrika-Amerika ırkında %47'sinde fokal segmental glomerulosklerozis olduğu saptanmıştır. Son 20 yılda FSGS oranlarında 10 kat kadar artış olduğu bildirilmektedir.

Değişik araştırmalarda nefrotik sendromlu çocuklar arasında FSGS %4 ile %32 kadar değişik oranlarda bulunmuştur (7-10).

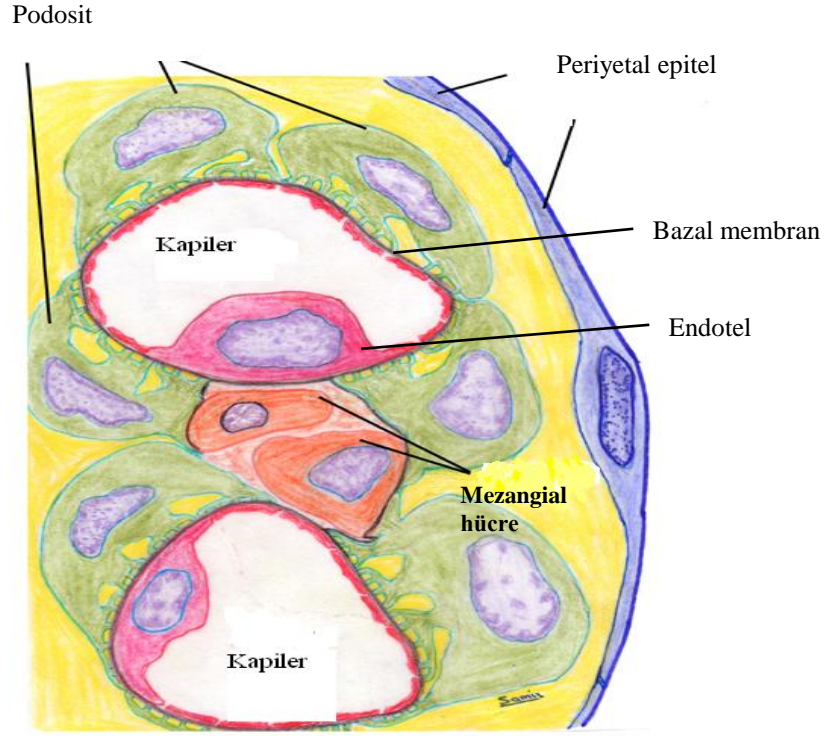
Türkiye'de 2007 yılı Türk Nefroloji Derneğinin verilerine göre böbrek biyopsisi yapılan çocuklarda %22,9 ile ilk sırada FSGS yer almaktadır. Ancak gerçek sıklığını, böbrek biyopsisi sadece steroid tedavisine dirençli olgulara yapıldığı için tahmin etmek güçtür (1,11). FSGS nedenleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. FSGS nedenleri.

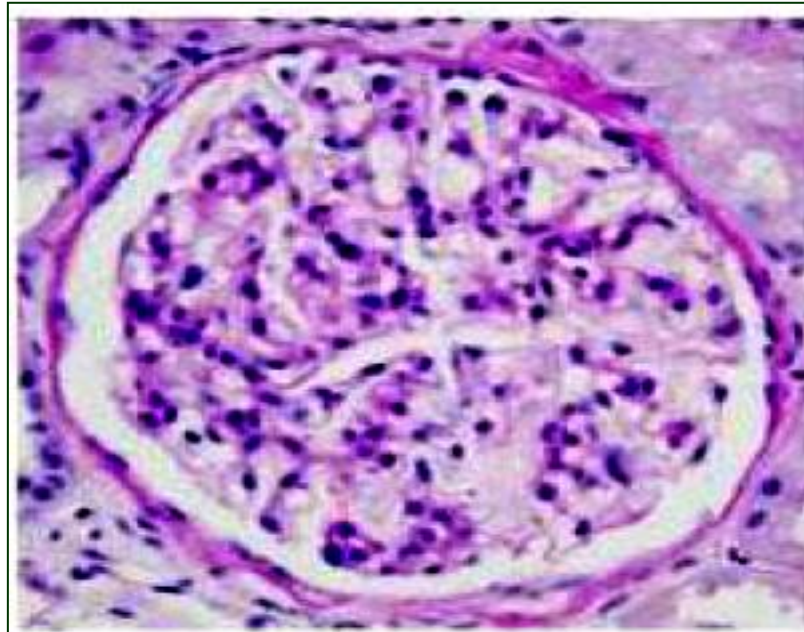
FSGS tipi	FSGS nedeni
Birincil FSGS	Dolaşımda bulunan geçirgenlik faktörleri
İkincil FSGS	Ailesel-genetik nedenler Nefrin mutasyonu Podosin mutasyonu α - aktinin 4 mutasyonu CD2AP mutasyonu WT-1 PLCE1 SMARCAL1 Mitokondropatiler β - integrin mutasyonu Laminin β 2 Virusa bağlı sekonder FSGS HIV-1 Parvovirus B-19

İlacı bağılı FSGS	SV40
	Citomegalovirus
	Eroin
	İnterferon- α
	Lityum
	Pamidronat
Adaptif fonksiyonel etkiler ile oluşan FSGS	Sirolimus
	A) Böbrek dokusunda azalma ile giden durumlar
	Oligomeganefronia
	Tek taraflı renal agenezi
	Renal displazi
	Reflü nefropatisi
	Kortekste nekroz sekeli
	Tek taraflı nefrektomi
	Kronik allograft nefropatisi
	Nefron yıkımı yapan hastalık
	B) Başlangıçta böbrek kütlesi normal olan durumlar
	Kan basıncı yüksekliği
	Vazo- oklüzif durumlar
	Obezite
Siyanotik konjenital kalp hastalığı	
Orak hücre anemisi	

Her bir böbrekte yaklaşık 600 000 ile 1 000 000 glomerül vardır. Glomerül, pencereci arteriol – kapiller damar sistemi, epiteliyal ayaklı çıkıntıları olan örtü ve aralardaki mezangial hücrelerden oluşmaktadır. Endoteliyal pencere sadece 70°A kalınlığı olan glomerüler bazal membrandan oluşmaktadır. Epiteliyal örtü ayaklı, ayaklı çıkıntıları ile damasal yapıyı sarmaktadır ve bu ayaklı çıkıntıların arasında aktin filamentlerinden oluşan slit diyaframın da bulunduğu kompleks bir bağlantı ünitesi vardır (12) (Şekil 1, Resim 1). Mezangial bölge matriks ve kontraktıl yapıdaki aktin, α -aktinin ve miyozin içeren mezangial hücrelerden oluşmaktadır. Fagositoz yapabilme yeteneğindedir, lizozomal yapılar içermektedirler. Anjiotensin II, prostaglandin, atrial natriüretik faktör için ve T lenfositleri için reseptörleri vardır (13).



Şekil 1. Glomerülün yapısı



Resim 1. Hematoksilen eozin ile boyanan normal glomerulus yapısı.

Gün içinde 110 - 135 litre plazma, belirli mekanik bir stres yaratan yaklaşık 60mmHg basınç ile endotel tarafından GBM, podosit bağıntı bölgelerini aşarak toplama ünitesine ulaşmaktadır. Filtrasyon sırasında podositler arası pencereci bölge büyük bir basınç ile süzme fonksiyonunu gerçekleştirmektedir. Süzme ile iyonlar, küçük molekülü basit yapılar ultrafiltrata geçerken, büyük moleküller bariyeri aşamamaktadır. Podositler olgunlaşmış hücreler olarak bölünme ve yeniden oluşma yeteneğine sahip değildir, kayıpları fonksiyonlarının yitilmesi ile sonuçlanmaktadır. Podositlerin hasarı glomeruler hasara neden olan bir dizi reaktif değişikliklere neden olmaktadır. Ortama sitokinler ve TGF- β , VEGF, PDGF gibi doku faktörlerinin salınması sonucunda FSGS'a kadar ilerleyen yangısal süreç başlamaktadır (14,15).

Fokal Segmental Glomerüloskleroz Histopatolojisi

Glomerüldeki lezyonlar tutulan bölgeye ve alana göre adlandırılmaktadır.

Fokal: ışık mikroskopunda glomerüllerin %50'sinden azının etkilendiği lezyon;

Segmental: glomerül yumağının sadece bir bölgesinde lezyon olması;

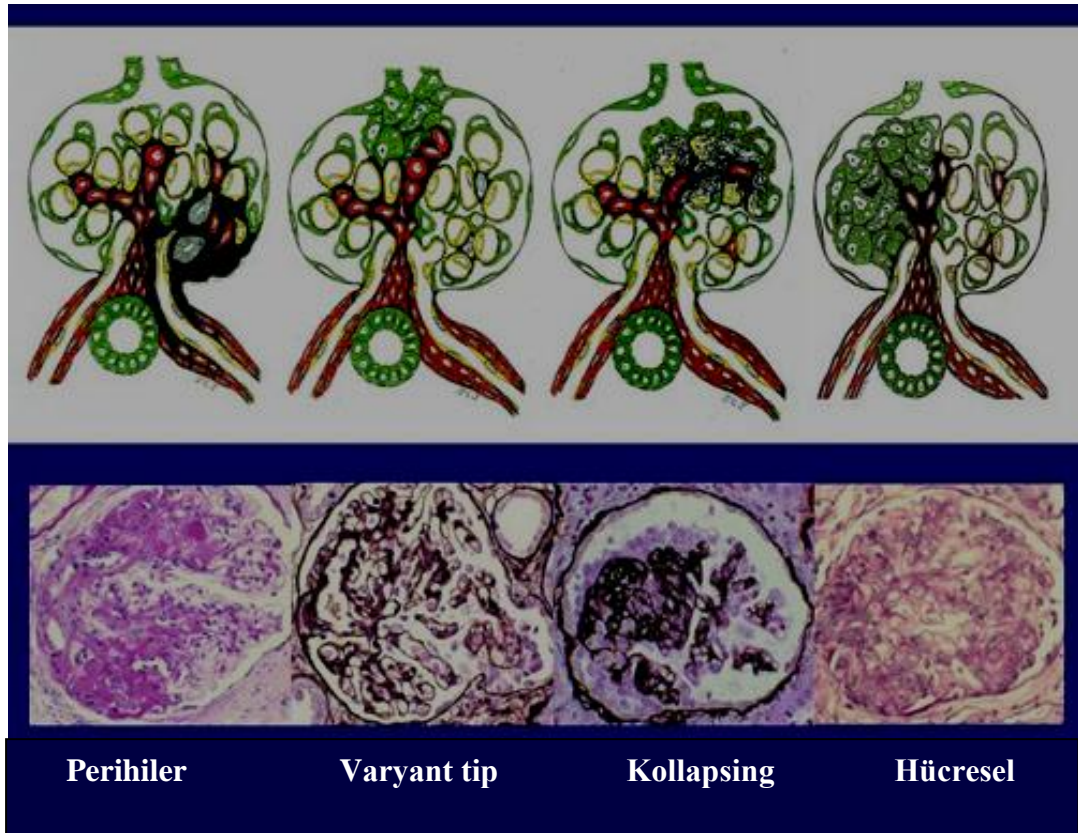
Global: glomerül yumağının tümünü içeren lezyon;

Glomerüloskleroz: segmental veya global kapiller kollaps veya kapiller lümenin kapanması ile birlikte yıpranma varlığı. Bu sklerotik alanlarda ultrafiltrasyon olmadığı kabul edilmektedir (16).

Fokal segmental glomerülosklerozda böbreğin bazı glomerülleri etkilenebilir, etkilenen glomerüllerde de glomerülün bir parçasında histolojik lezyon oluşmaktadır. Glomerüloskleroz gelişiminde erken dönemde derinde bulunan jukstamedüller glomerüller etkilenebilir. Glomerül yumağının hiler bölgesi veya

periferinde lezyon oluşmaktadır. Glomerülün epitel hücrelerinde glomerül bazal membranda kalınlaşma, subendotelyal bölgede hiyalin birikimi, glomerül kapiller lümende kollaps ve iskemi ile karakterize sklerotik lezyon oluşmaktadır. Sklerotik bölge içinde hiyalin materyel birikimi, çevresinde şeffaf bir zon oluşmaktadır. Lezyonlar Bowman kapsülüne yapışık veya bağlantısız olabilir. Bowman kapsülü ile bağlantısız lezyonların çevresindeki podositler hipertroftir. Bowman kapsülüne yapışık lezyonlarda, kollabe olan kapiller yumak ile Bowman bazal membranı arasında yapışıklıklar görülmektedir. Glomerülün geri kalan nonsklerotik kısmında ise mezangial proliferasyon ve podosit ayakları çıkıntılarında yapışıklıklar vardır. Glomerül hipertrofisi genellikle eşlik etmektedir. Mezangial matrikste, lipid depolanması, mononükleer hücrelerin infiltrasyonu ve toplanması ile hacim artışı olur, mezangial matriks kümelenmesi ve hücresel artış görülmektedir (17-20). Lezyonlu glomerül yakınındaki interstisyel alanda tübüler atrofi, interstisyel fibrozis görülmektedir. İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi böbreğin hasar derecesi ile orantılıdır. EM’da paramezangial ve subendotelyal granüller, endotel hücrelerde şişme veya silinme, mezangial matrikste artış izlenmekte, depozitlerin ortasında veya endotelyal ve mezangial hücrelerin sitoplazmasında yağ vakuelleri görülebilmektedir. Bowman kapsülü ile bazal membran arasındaki yapışıklıklar asellüler materyelin bir araya toplanması ile meydana gelmektedir ve bazal membranları görülür hale getirmektedir. Epitel sitoplazmasında fokal dejenerasyon, hücresel yapıların membran yapısında bozulmalar, bazal membranın hücre yüzeyinden ayrılması ve bölgenin hücresel debris ile dolması ile sonuçlanmaktadır. Bazı olgularda glomerül yumağının global kollapsı ve epiteliyal hücrelerin belirgin hipertrofisi izlenmektedir, bu tip lezyonlara kollabe FSGS denilmektedir. Klinik

olarak hızlı bir şekilde böbrek yetmezliğine ilerlemektedirler. Bu olgularda ilk değişiklikler podosit hücre yüzey proteinlerinin kaybı, makrofaj belirteçlerinin, sitokeratin, proliferatif hücre nükleer antijen Ki-67 salınımıdır. Bu düzensizlik sonucunda podositin bazal membrandan ayrıştığı gözlenmektedir. Kontrolsüz bir yıkım yapım mekanizmasının işlev yaptığı FSGS'da glomerülde geri dönüşümsüz bir hasar oluşmaktadır. Glomerülöskleroz perihiler bölgede olabilir, bu tip olgularda prognoz daha iyidir. Özellikle böbrek kütle yitimi ile olan olaylarda daha sık görülmektedir. Glomerülün periferinde olan lezyonlar daha iyi seyirlidir, çocukluk çağında sık görülmektedir. Hücresel tip lezyonda epitelyum hücrelerinin segmental proliferasyonu, kapiller hipersellülarite ve skleroz vardır (Şekil 2, Tablo 2) (21-24).



Şekil 2. Glomerülösklerozda lezyon tipleri

Tablo 2. FSGS’da meydana gelen histopatolojik değişiklikler (25).

Patolojik bulgu	Yüzde (%)
Segmental glomerüler damar kollapsı	100
Tübülointerstisyel hastalık	86
Glomerül endotel hücre şişmesi	82
Bazal membranda lamina interna genişlemesi	82
Hiler başlangıç tutulumu	80
Visseral epitel hücre kümelenmesi	62
Glomerüler hiyalinoz	60
Fokal mezangial hücre artımı	57
Glomerüler intrakapiller köpük hücreler	49
Diffüz mezangial hücre artımı	39
Elektron mikroskopunda glomerüler birikim	24
Damar duvar kalınlaşması	13

Fokal Segmental Glomerülöskleroz Patogenezi

FSGS dokuda hasarlanma ve fibroze kadar ilerleyen yangısal bir süreçtir. Bu olayda proliferasyon ve hücre ölümü olayları arasındaki denge bozulmaktadır. Mezangial hücreler aktive olarak aşırı sentez yeteneğine sahip olan mezangioblast haline dönüşmektedir (26). FSGS etiyopatogenezinde rol oynayan çeşitli faktörler bulunmaktadır, humoral ve hücrel immünite, koagülasyon sistemi, kompleman sistemi (C5b-9 atak kompleksi), masif proteinüri, hemodinamik faktörler, yaşlanma, podosit hasarı, sistemik faktörler, lipid metabolizması, mezangial hücre hasarı ve genetik faktörler suçlanmaktadır (27,28). Ayrıca FSGS oluşumunda monosit-

makrofaj sistemi, lenfokinler, monokinler, α -aktin, fibroblastlar, epitel hasarı, endotel hücreler de rol oynamaktadır. Büyüme faktörleri, bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), trombositlerden salgılanan büyüme faktörü (PDGF), β dönüştürücü büyüme faktörü (β -TGF) glomerülo nefritlerde önemli rol oynamaktadırlar (29). Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) kronik böbrek hastalıklarında oluşan yangıda ve hasarda görev yapan bir sitokindir. TNF- α 'nın, makrofajları yangı hücrelerine dönüştürme, bölgede nötrofil granüllerini salgılatma ve hasar oluşturacak oksijen radikallerinin sentezini başlatma gibi etkileri vardır. Aynı zamanda hedef dokudaki hücrelerde apoptozu ve nekrozu tetiklemektedir (30,31).

T-lenfositler: Ratlara antitübüler bazal membran antijeni verilmesi ile T hücre aracılı interstisyel nefrit oluşturulmaktadır. Dolaşımdaki aktif T lenfositlerinin proteinüriye neden oldukları, glomerüler bazal membranın geçirgenliğini artırdıkları ve GBM negatif yükünü değiştirdikleri saptanmıştır (32,33).

PDGF (platelet derived growth factor): Düz kaslar, fibroblastlar ve glomerüler mezangial hücreler için major mitojendir. Trombositlerde sentezlenmektedir ve kanın koagülasyonu esnasında salınmaktadır. Aynı zamanda aktive makrofajlar, bazı kanser hücrelerinden de salgılanmaktadır (34). İmmünohistokimyasal çalışmalar ile B tipi PDGF reseptörleri kronik yangılı dokularda gösterilmiştir. Mezangial proliferasyon olan glomerüllerde, damar düz kaslarında, interstisyel infiltratif bölgede fibroblast benzeri hücrelerde de PDGF reseptör artışı saptanmıştır. PDGF reseptör yoğunluğu olan bölgelerde paralel olarak aktif makrofajların sayısında da artış olduğu görülmüştür (35). Hayvan modellerinde nefrotoksik nefrit ve proliferatif sklerotik glomerulonefritlerde de PDGF'ün rol oynadığı düşünülmektedir (36).

TGF – β : Deneysel çalışmalarda skarlanmış glomerüllerde TGF – β sekresyonu arttığı ve sitoskeletal elemanların, α -aktinin, fibronektinin mezangial fibroblast ve miyofibroblastlardan sentezlenerek glomerüloskleroz ve tübüler fibrozise yol açtığı gösterilmiştir. Ekstraselüler matriks artışına neden olmaktadır, aynı zamanda yapımı artırırken yıkımını da durdurmaktadır (37,38).

Desmin, vimentin: Glomerüler epitel hücrelerinden yüklenme durumunda (hiperfiltrasyon gibi) desmin ve vimentin salgılanarak glomeruloskleroz olduğu belirtilmiştir. Sitoskeletal proteinler radixin ve moezinin de glomeruloskleroz patogenezinde rol aldıkları gösterilmiştir (39).

Anjiotensin II: Glomeruloskleroz patogenezinde hiperfiltrasyon ve intraglomerüler basınç artışında anjiotensin II suçlanmaktadır. Efferent arteriolün anjiotensin II ile vazokonstrüksiyonu sonucunda hiperfiltrasyon ve intraglomerüler basıncın artması glomeruloskleroza başlatıcı olaylardır (40). Deneysel çalışmalarda anjiotensin II reseptör antagonistlerinin intraglomerüler basıncı ve proteinüriyi azaltarak glomeruloskleroz oluşumunu da azalttıkları gösterilmiştir (41). Anjiotensin II mezangial hücrelerinin çoğalmasını uyararak mezangial matriks artışına yol açmaktadır. Ayrıca anjiotensin II mezangial ve epitelyal hücrelerde α aktinin ve desmin yapımını da artırarak sklerotik gidişe katkıda bulunmaktadır (42). Epidermal büyüme faktörüne (EGF) proksimal tübül hücrelerin duyarlılığını artırarak hipertrofiye olmalarına neden olmaktadır. Distal ve toplayıcı tübül hücreleri de anjiotensin II etkisi ile proliferasyon olmaktadır (43).

Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri: Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin doğrudan böbrek ve glomeruler hipertrofiyi baskıladığı için glomeruloskleroza önleyici etkisi olduğu belirtilmektedir (44).

Hiperlipidemi: Yüksek serum total kolesterol, trigliserid, LDL ve aterojenik olan lipoprotein (a) seviyeleri, damarlarda ateroskleroza neden olmaktadır. Aynı zamanda da mezangial hücreleri tarafından hücre içine alınan lipidler glomerülün de damarsal yapısı olması nedeni ile aynı mekanizma ile glomeruloskleroza neden olmaktadır (45).

Sitokinler: İL-1 doku zedelenmesi sırasında akut inflamatuvar yanıtta görevli bir sitokindir. Lezyon bölgesine lökosit göçünü, kemotaktik faktörlerin sentezini (monosit kemoatraktan protein -1, RANTES), lökosit adezyon molekülleri ICAM-1 ve VCAM-1'in sentezini tetiklemektedir. Bu yangısal yanıtta reaktif oksijen radikalleri, nitrik oksid, metaloproteinazlar, eikozanoidler, TNF- α , PAF da eşlik etmektedir. Fibroblast proliferasyonunu da stimüle ederek olay fibrozise kadar ilerlemektedir. İL-1 inflamasyon sırasında İL-6, İL-8 gibi diğer sitokinlerin, ayrıca TNF- α 'nın da sentezlenmesini sağlamaktadır (46,47).

Sistemik kan basıncı yüksekliği: Glomerül içi basıncı yükselttiği için glomeruloskleroz gelişiminde rol oynamaktadır (48).

Fibrojenik büyüme faktörü (FGF): Mezangial hücrelerin çoğalmasını ve glomerüler ekstrasellüler matriksin sentezlenmesini tetiklemektedir. Glomerüler ekstrasellüler matriks yapımının artması ve yıkımının baskılanması ile glomeruloskleroz oluşmaktadır. FGF yangısal dokuda, skarlı glomerülde üretilmektedir. Endotel hasarı, intraglomerüler basınç artışı ve epitelyal gerilme, hiperlipidemi ve mezangial hücrelerin lipid alımı FGF üretimi ve glomeruloskleroza gidişi tetiklemektedir. İnterstisyel fibroblastların ve miyofibroblastların aktivasyonunda da FGF'ün büyük rolü olduğu bildirilmiştir (49).

Glomeruloskleroza tübülointerstisyel alandan bağımsız düşünmek doğru olmaz. Tübülointerstisyel alanın tutulması oranında böbrek yetmezliği kliniği meydana gelmektedir. Tübülointerstisyel bölgenin skarlanması glomeruloskleroza ile benzer bir mekanizma ile oluşmaktadır. Sağlam kalan tübüllerin hiperfonksiyon ve metabolizma artışı ilk değişikliklerdendir (50). Tübüler epitel yangısal yanıtta önemli rol almaktadır. Tübüler epitel hasarından antikorlar, monosit/makrofajlar, lizozomal enzimlerin ortaya çıkması, serbest oksijen radikalleri, kompleman, nefrotoksik diyet (aşırı protein ve fosfat alımı), hiperlipideminin sklerotik etkileri ve obstruksiyon suçlanmaktadır. Yangı ve yangısal yanıt, yangısal hücrelerin hücumu ile ortama sitokinlerin ve serbest oksijen radikallerinin salınımı tetiklenmektedir. Bu olaylarda fibroblastlar önemli rol almaktadır (51,52).

Kollajen III: Deneysel ve klinik çalışmalarda glomeruloskleroza gelişimi sırasında mezangial ve epitelyal hücrelerde düz kas ve embriyojenik belirteçler saptanmıştır. Ayrıca bu hücrelerden mezenkimal, interstisyel bölgeye kollajen I ve III salındığı da vurgulanmıştır (53). Normal glomerülde tespit edilmeyen, ancak skleroze glomerülde ve kresent oluşumu sırasında yapışıklıkların olduğu bölgelerde, interstisyel ve paramezangial bölgede kollajen III' n sentezlendiği gösterilmiştir. Kollajen IV bazal membran yapısında ve mezangial bölgede yapısal olarak bulunmaktadır (54,55).

Genetik faktörler: Son yıllarda steroide dirençli olgularda yüksek oranlarda genetik kökenli bozuklukların varlığı saptanmıştır. Podosit özgü genlerde mutasyon/polimorfizm ile podosit hasarı FSGS patogenezinde önemlidir. Steroide dirençli olgularda NPHS2 mutasyonu %24 gibi yüksek oranda görülebilmektedir (56). Diğer genetik bozukluklar Tablo 1'de verilmiştir.

FSGS Tedavisi

Semptomatik tedavi:

Diyet: Nefrotik sendromlu olguların diyetinde protein kısıtlaması yapılmamaktadır. Tuz ve sıvı kısıtlaması ödemin atışını önlemek amacı ile yapılmaktadır. Ödemli olgularda çok düşük sodyumlu diyet verilmektedir. Hiperlipidemi olması nedeni ile doymuş yağların kısıtlanması uygun olacaktır. Karbonhidrat olarak da lipid metabolizmasındaki dengeyi daha da bozacak olan sukrozlu gıdalar yerine nişasta, dekstrin-maltoz içeren gıdalar tercih edilmelidir (57).

Albümin: Hızlıca serum albümin düzeyinin düşmesi ve kullanılan diüretik tedaviler ile hipovolemi ortaya çıkmaktadır. Albümin infüzyonu, intravasküler volümün azaldığının ve interstisyel ödemin belirtileri varsa, akciğer ödemi, dolaşım yetmezliği gelişmişse kalp hızı, solunum, kan basıncı monitorizasyonları ile yapılmaktadır.

Diüretik: Hipovolemi olmayan olgularda ödemi azaltmak için verilmelidir. Yine albümin infüzyonu ile birlikte ve anazarka tipinde ödemi olan olgularda verilebilir. Ancak bu olgularda hipovolemi olması nedeni ile akut böbrek yetmezliği ve elektrolit dengesizlikleri yakından izlenmelidir. Diüretiklerin artırdığı hipovolemi tromboemboli riskine yol açmaktadır (58).

İlaç tedavisi: Çocukluk çağı nefrotik sendromunun en sık nedeni olan minimal lezyon hastalığında genellikle 4 – 8 haftalık yüksek doz prednisolon tedavisine % 89 yanıt alınmaktadır. Ancak fokal segmental glomerulosklerozda steroid tedavisine sadece %20 oranında yanıt alınmaktadır. Mevcut tedavilerden steroidin ve diğer immünosupresif ilaçların (siklofosamid, siklosporin, mikofenolat mofetil) fazla yan etkileri bulunmaktadır. Büyüme gelişme çağındaki çocuklarda steroidler kemik

gelişimini baskılamakta, hipertansiyon, hiperglisemi gibi yan etkilere neden olmaktadır. İmmünosupresif ilaçlar enfeksiyona eğilim oluşturmaktadır ve nefrotoksiktir (59).

Steroid: Steroid tedavisi ile amaç akut yangıyı ve proteinüriyi baskılamaktır. Yaklaşık %5 olguda ilk iki haftada spontan remisyon olabildiği için tedaviye başlamadan önce hastanın enfeksiyon (özellikle Tbc) yönünden iyi değerlendirilmesi gerekmektedir. Prednisolon ilk atak tedavi şeması şöyle yapılmaktadır:

4 hafta 2 mg/kg/gün (veya 60mg/m²/gün), 2 dozda (maksimum. 60 mg/gün)

4 hafta 2mg/kg/gün aşırı, tek dozda,

2 hafta 1,5 mg/kg/gün aşırı, tek doz

2 hafta 1 mg/kg/gün aşırı, tek doz

2 hafta 0,5 mg/kg/gün aşırı, tek doz

2 hafta 0,25 mg/kg/gün aşırı, tek doz.

Daha sonraki atakların tedavisinde 2 hafta 2 mg/kg/gün tedavisinden sonra remisyon elde edilmişse 2 hafta aralarla gün aşırı, doz yarıya düşülerek devam edilir. Proteinüri devam ediyorsa günlük tedavi 4 haftaya uzatılır, 2 hafta yüksek dozdan gün aşırıya geçilir ve 2 hafta aralarla doz yarıya düşülerek tedavi tamamlanır (60, 61).

Pulse metil-prednisolon ve diğer tedaviler ile kombinasyonu: Steroide yüksek oranda dirençli olan FSGS'lu olgularda metil-prednisolonun içinde olduğu üçlü ilaç kombinasyonları ile iyi sonuçlar elde edilmektedir. İki haftalık sürede 6 pulse metil-prednisolon ve gün aşırı prednison tedavisi ile 1) Proteinüri kontrol altına alınamamış ise; 2) Kısmi cevap alınmış, ancak herhangi bir zamanda proteinüri çok

artmış ise veya 3) 10 haftanın sonunda halen nefrotik düzeyde proteinüri sürüyorsa alkalizan bir ilaç tedaviye eklenmektedir.

İntravenöz metil-prednizolon tedavi şeması (Mendoza protokolü):

İlk 2 hafta 30mg/kg, haftada 3 defa, toplam 6 doz

3-10. haftalar 30mg/kg, haftada bir, toplam 8 doz

11-18. haftalar 30mg/kg, 2 haftada bir, toplam 4 doz

19-50. haftalar 30mg/kg, 4 haftada bir, toplam 8 doz

51-82. haftalar 30 mg/kg, 8 haftada bir, toplam 4 doz (62, 63).

Siklofosamid: 2-2,5 mg/kg/gün, kuru ağırlık üzerinden hesaplanarak, 8-12 hafta süre ile verilmektedir. Ancak kemik iliği depresyonu, hemorajik sistit, alopesi, enfeksiyonlara eğilim gibi kümülatif dozdan bağımsız akut yan etkileri vardır. Kümülatif doz hafif kişisel farklar ile 150 – 250 mg/kg'ın aşılması halinde kronik toksisite bulguları oligo – azospermi, overde fibrozis, malignite, pulmoner fibrozis görülmektedir. FSGS olgularında siklofosamid tedavisinden sonra %76 gibi yüksek relaps bildirilmektedir (64).

Siklosporin: Solid organ ve kemik iliği transplantasyonlarında kullanılan immünosupresif bir ajandır. Pediatrik hastalarda steroide bağımlı nefrotik sendromlu olgularda daha etkili olduğu düşünülmektedir. Düşük doz gün aşırı prednizolon tedavisi ile birlikte kullanıldığında daha iyi sonuçlar alınmaktadır, ilaç kesilmesi ile relaps siktir. Siklosporin dozu 150–200mg/m² olarak uzun süre kullanılabilir, ancak nefrotoksik bir ilaçtır. Tübülointerstisyel hasar, tübüler atrofi, interstisyel fibrozis biyopsi bulgularıdır. Nefrotoksitesi için böbrek fonksiyonlarında bozulma henüz görülmediği aşamada erken tanı için periodik olarak biyopsi takibi yapılması önerilmektedir (65,66).

Azitiyoprin: Nefrotik sendrom relaps tedavisinde kullanılan azatioprin etkili bulunmamıştır (67).

Levamizol: İmmünostimulan etkisi olan bu ilaçla ilgili çelişkili sonuçlar vardır. Düşük yan etki potansiyeli ve steroid kullanımından sakınma gibi avantajlı gibi görünen sonuçları bildirilmektedir, ancak steroide dirençli nefrotik sendromda etkinliğini kanıtlayacak yeterli veri yoktur (68).

Anjitenin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri: Steroide dirençli nefrotik sendrom vakalarında son yıllarda artan oranda ACE inhibitörleri kullanılmaktadır. Transkapiller hidrostatik basıncı azaltmaları, glomerüler kapiller plazma akımını düşürmeleri, glomerüler filtrasyon bariyerinin seçici geçirgenliğinin bozulmasına da etki ederek anti-proteinürik etkileri olduğu düşünülmektedir. Ancak tam remisyon sağlanan vakalar azdır. Bu gruptaki ilaçların ümit vaat eden diğer bir özeliği de glomerüloskleroza bozulmuş olan endotelial ve epitelyal hücre etkileşiminde düzenleme yaparak gelişmiş olan glomerüloskerozu geri çevirebilme yeteneğinin saptanmasıdır (69,70).

Mikofenolat mofetil: Lenfositlerin proliferasyonunu inhibe ederek etki etmektedir. Mikofenolat mofetil steroide bağımlı nefrotik sendromlu olgularda azaltılmış steroid tedavisi ile birlikte kullanıldığında iyi sonuçlar elde edilmiştir (71). FSGS ve steroide dirençli olgularda ACE inhibitörleri ile birlikte kullanıldığında proteinüriyi azalttığı gösterilmiş, ancak tam remisyon oranları düşük bulunmuştur (72).

Takrolimus: Hızlı bölünen aktif hücrelerde gen transkripsiyonunu inhibe ederek etki eden bu ajan lenfositlerde İL-2 gen transkripsiyonunu da inhibe etme yolu ile immünosupresyon sağlamaktadır. Steroide dirençli NS ve FSGS olgularında

siklosporinden daha etkili olduğu belirtilmektedir. Ancak bu ilacın yan etkileri fazladır ve nefrotoksik etkisi bulunmaktadır (73).

Plazmaferez ve immünoadsorbsyon: FSGS patogenezinde bazal membran geçirgenliğini etkileyen dolaşımında aktif maddeler suçlanmaktadır. Bu nedenle plazmaferez ve immünoadsorbsyon yöntemlerinin bu hastalıkta etkili olacağı düşünülmüştür. Az sayıda çalışmada steroid ve alkalizan ajanlar ile birlikte kullanıldığında etkin olduğu gösterilmiştir (74).

Antioksidan tedavi: Lipid peroksidasyonunun arttığı, FSGS’de deneysel çalışmalarda siklosporin ile birlikte verilen vitamin A,D ve E ile proteinüri oranlarının düştüğü gösterilmiştir (75).

FSGS prognozu:

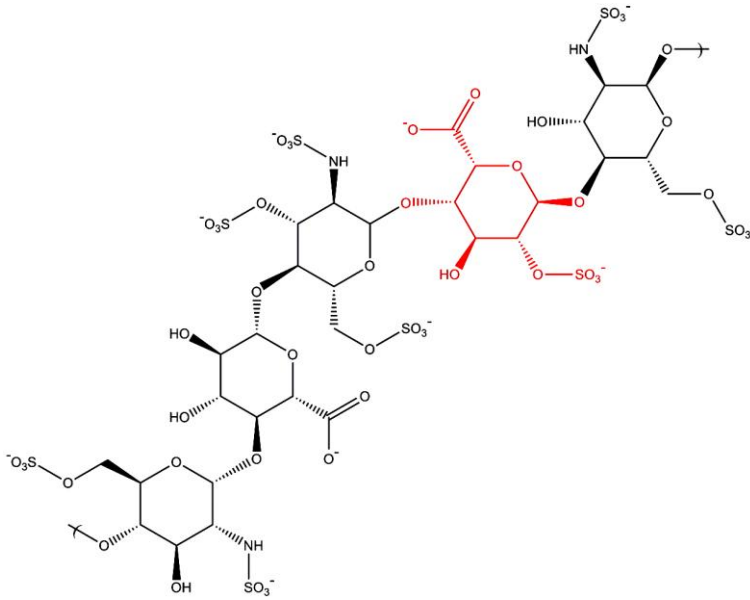
FSGS’un 10 yıl sonunda yaklaşık %20’sinin böbrek yetmezliğine ilerlediği bildirilmektedir (5 yılda %8, 10 yılda %17, 15 yılda %32) (76). Beaufils ve arkadaşları (77) uzun süre takip edilen olgularda nefrotik sendromun sebat etmesi durumunda 10 yıllık böbrek yaşamı %45, sadece proteinüri varsa %91 olduğunu bildirmişlerdir. Transplante olguların %30’unda nefrotik sendrom relaps görüldüğü ve glomerüler lezyonların tekrarladığı ve %5 kadar olgunun da greft kaybına gittiği bildirilmektedir. Tekrarlama riski 15 yaş altındaki ve hastalığı hızlıca son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyen olgularda daha yüksek bulunmuştur (78,79).

Heparin ve türevleri

Heparin, sülfalanmış şeker sekanslarından oluşan bir polisakarid glukozaminoglikandır (Şekil 3).Yapısındaki şeker kısımları N-asetilglukozamin, glukoronik asid, iduronik asittir. Molekülde yoğun olarak bulunan sülfat grupları heparine güçlü bir anyonik özellik yüklemektedir. İlk olarak 1922 yılında karaciğerde saptandıkları için heparin olarak adlandırılmışlardır. İlaç olarak kullanılan heparin domuz bağırsağından veya sığır akciğerinden elde edilmektedir, 7000 – 40000 dalton molekül ağırlığındadır. Preparatlar içinde 1mg =130 Ü etkinlik göstermektedir. Heparinin 1 Ünitesi, 0 °C’de 1 ml kedi kanın 24 saat pıhtılaşmasını önleyen miktardır. Ağız yolu ile alındığında emilmez, sistemik dolaşıma verildikten sonra hızlıca retikuloendotelial sistem ve endotel hücreleri tarafından alınır. Damar endotelindeki konsantrasyonu plazmadakinin 100 katıdır. Plasentadan fetusa geçmez bu nedenle gebelerde de kullanımı vardır (80). Etkilerini antitrombin III’ü aktif hale getirerek pıhtılaşma kaskadındaki diğer proteazları inhibe etmek (trombin, faktörler XIIa, XIa, Xa, IXa ve kalikrein) yolu ile göstermektedir. Plazma kofaktör II üzerinden de etki etmektedir. Trombin ve faktör Xa’nın inhibisyonu antikoagülan etkisine en fazla katkıda bulunmaktadır. Heparinler trombinin fibrinojen üzerine etki yaparak ve doğrudan trombinin aktivitesini baslılayarak fibrinojenin fibrine dönüşmesini önlemektedir. Heparin antitrombin III ile birlikte trombositlerin agregasyonunu da engellemektedir. Endotel yapısındaki lipoprotein lipazı aktifleştirdiği de bilinmektedir. Memelilerin mast hücreleri ve bazofillerinde salgı granülleri olarak da bulunmaktadır. Diğer doğal heparinler heparinoidler olarak adlandırılan dermatan sülfat ve heparan sülfattır. Heparan sülfat birçok dokunun yapısında bulunduğu gibi, böbrek bazal membran ve glomerüler matrikste de

bulunmaktadır. Yapısındaki sülfat grupları heparan sülfata yoğun elektronegativite vermektedir, GBM'in anyonik yapısının başlıca nedenidir.

Heparin preparatları heparin sodyum, heparin kalsiyum ve düşük ağırlıklı heparinlerdir. Düşük molekül ağırlıklı heparinler klasik heparinlerin depolimerizasyonu ile elde edilmektedir. Molekül ağırlıkları ortalama 5 000 daltondur. DMAH'in antitrombin etkileri düşüktür, anti faktör Xa etkileri güçlüdür. Bu nedenle aPTZ'i uzatma yetenekleri çok düşüktür. Klasik heparinlere göre antitrombotik etkileri aynı olmakla birlikte kanama yapıcı özellikleri azdır, biyoyararlanımları yüksektir ve yarılanma ömürleri uzundur. Etkinlikleri heparin ünitesi ile değil anti-Xa ünitesi olarak ölçülmektedir. Bu grupta enoksaparin, nadroparin, reviparin, tinzaparin, dalteparin, certoparin, danaparoid ve yeni kuşak sentetik olan fondaparinux vardır (81-84).



Şekil 3. Heparin molekülünde yer alan sülfatlanmış şeker birimleri

Düşük molekül ağırlıklı heparinler

Düşük molekül ağırlıklı heparinlerin (DMAH), son yıllarda antitrombotik etkilerinin yanında, antiinflamatuvar, antianjiogenik, antilipemik ve antifibrotik etkileri nedeniyle, doku hasarında koruyucu özelliklerinin olduğunu gösteren araştırmalar vardır. Yarı sentetik bir heparin polimeri olan K5NOSepiLMW ile deneysel olarak siklooksijenaz-2 ve nitrik oksid sentaz inhibisyonu ile lokal inflamatuvar mediatörlerinin sentezinin, lökosit göçü, IL-1 β ve TNF- α sentezinin önlendiği gösterilmiştir. Bu özellikleri ile yeni kuşak non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar olarak da adlandırılabilirler (85). Lipopolisakkarid ile uyarılan monositlerin heparin tedavisi altındayken IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılamadıkları gösterilmiştir (86). DMAH'in deneysel peritonit modelinde doku ödemi, nötrofil göçünü, lökosit adhezyonunu ve transmigrasyonunu azalttıkları gösterilmiştir (87). Adhezyon molekülü olarak enflamasyonu başlatmada rolü olan P-selektinin de heparin deriverileri ile yapışma fonksiyonunun inhibe olduğu bulunmuştur (88). Gabr ve arkadaşları (89) tarafından heparin ve heparan sulfatın fare akciğer alveollerinde fibroblast çoğalmasını azaltarak remodeling safhasını hafiflettikleri gösterilmiştir. Deepa (90) yaptığı rat deneyinde sertoparin sodyumun kan lipid profilini düzelttiğini göstermiştir. Itoh ve arkadaşları (91) tarafından nötrofillerden oksijen radikallerinin salınımının yüksek doz heparin ile azaltıldığı gösterilmiştir. Marmara Üniversitesinden Ali Civelek ve arkadaşları (92) deltaparinin yara iyileşmesi üzerine etkilerini incelemiş ve ödem, yangı, fibroblast çoğalmasının deltaparin verilen ratlarda baskılandığını göstermişlerdir.

Hemodiyaliz hastalarındaki İL-6, İL-8, İL-12 ve TNF- α gibi proinflatuar ve aterosklerotik değişikliklerin öncüsü olan sitokinlerin dengesizliğinin DMAH verilen hastalarda düzeldiği de saptanmıştır (93). Glomerüler bazal membran yapısında bulunan heparan sülfatın minimal lezyon hastalığı, diyabetik nefropati ve membranöz glomerulopati gibi renal patolojilerde salınımının azaldığı saptanmıştır (94). Diğer bir araştırmada proliferatif glomerulonefritli steroid, siklofosamid ve anjiotensin II reseptör blokeri alan hastalar iki gruba ayrılıp, araştırma grubundaki hastalara ek olarak fraksişarin verilip izlenmiştir. Fraksişarin alan hastalardaki proteinüri 4. haftada diğer grup ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük, 8. ve 12. haftalardaki GFR daha yüksek bulunmuştur (95).

Adriyamisinele oluşturulan FSGS hayvan modeli

Adriyamisine (ADR, doksurubisine) bir antineoplastik antibiyotiktir. Deneysel çalışmalarda ratlarda nefropati ve FSGS modeli oluşturmak için kullanılmaktadır. ADR 3, 5, 7.5 veya 15 mg/kg kuyruk veninden tek doz verildikten 1-2 hafta sonra ratlarda proteinüri, hipoalbuminemi, hiperlipidemi, hiperkoagulibilite, ödem oluşmaktadır. Histopatolojik olarak da proteinürinin başladığı erken dönemde (1-2. haftalarda) böbrek korteksinde yangısal hücre infiltrasyonu, glomerül ayaksı çıkıntılarda anyonik değişiklikler ve sialik asit kaybı olduğu gösterilmiştir. 3. haftadan sonra böbrek fonksiyonlarında bozulmaya paralel olarak histopatolojik değişikliklerin de oluşmaya başlamaktadır, mezangial yatakta genişleme, interstisyel fibrozis, tübüler atrofi meydana gelmektedir. Glomerulosklerozun en iyi oluştuğu dönem 8-12 haftalardır. Düşük dozlarda glomeruloskleroz oluşturma daha zordur, glomeruloskleroz oluşumunu artırmak için ek olarak hiperlipidemi oluşturmak gibi

ek yöntemlere gerek vardır. (96-102). Antrasiklin grubu kemoterapötiklerden olan adriyamisin ratlarda demir-antrasiklin kompleksi oluşturarak nefropati yapmaktadır. Adriyamisinin aktif metaboliti vücutta oksijen molekülü ile reaksiyona girmektedir. Demir-antrasiklin kompleksi lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikalleri oluşturmaktadır. Bu maddeler önemli hücresel komponentlerde, mikrozom, sitozol, membran lipitlerinde ve mitokondrialarda oksidatif hasar oluşturmaktadırlar (103,104). Hücresel membranların hasarlanması podositlerde belirgindir. Podosit hasarı ile masif proteinüri oluşmaktadır. Adriyamisinin direkt etkisi ve proteinürinin de tetiklediği hiperlipidemi de oluşarak böbreklerde glomerüler sklerozise kadar ilerleyen hasarlanma oluşmaktadır. Proteinüri, hiperlipidemi, böbrek fonksiyonlarında bozulma, ağırlık kaybı kliniği ile giden nefropati meydana gelmektedir. Yüksek doz adriyamisinle toksik belirtiler daha belirgin ve yoğun oluşmaktadır (105,106).

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvan deneyi Adnan Menderes Üniversitesi (ADÜ) Temel Tıp Bölümü Hayvan Deneyleleri Laboratuvarında yapıldı. Ratlar Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesinden temin edildi. Biyokimyasal incelemeler ADÜ Biyokimya laboratuvarında, histopatolojik incelemeler ADÜ Patoloji laboratuvarında yapıldı. Çalışmaya başlamadan önce Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulundan araştırma için onay alındı (Ek 1).

Ratlar ve Bakımları

Wistar Albino cinsi (Resim 2), ağırlıkları 195- 240g arası olan 32 adet yetişkin (sekiz haftalık) erkek rat deneye dahil edildi. Beslenmeleri % 20 protein içeren rutin rat yemi ile yapıldı ve aldıkları kadar su verildi. 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık siklusunda, 22°C (\pm 1°C) ısıda ve %55 (\pm %10) nemli ortamda standart bakımları yapıldı. Deney boyunca bakım kafeslerinde takip edilen ratlar, 0., 15. ve 30. günlerde 24 saat süreyle metabolik kafeste izlendi, sıvı ve katı gıda alımları ölçüldü ve 24 saatlik idrarları toplandı.



Resim 2. Wistar albino cinsi rat.

Deney Grupları ve FSGS Modelinin Oluşturulması

Deneyde FSGS modeli adriyaminle oluşturuldu (107). Yaptığımız ön çalışmada hayvan kaybı gözlemlendiği için deneyin toplam süresi 32 gün olarak belirlendi. Deneyin başlangıcı 0. gün olarak alındı. Deney süresince yapılan intravenöz enjeksiyonlar kuyruk veninden yapıldı.

Kuyruk veninden enjeksiyon:

Eter anestezisi altındaki ve sabitleyicinin içine alınan ratın kuyruğu ılık suyla temizlendi, alkol ile silindi. Kalın sütün ipe ile kuyruğa turnike yapıldı, 3-5 sn beklendi. Belirginleşen dorsal vene insulin iğne ucu takılmış 2,5 cc'lik iğne ile yaklaşık 15-20 derece açı ile girildi. Venin içinde bulunduğu iğne ucuna dolan kan nedeni ile karar verildi ve diğer kişinin yardımı ile turnike açıldı, çok yavaş, 3-5 dakikada ilaç zerk edildi. Dorsal vene girilemez veya venin dışına çıkmışsa lateral venlerden biri enjeksiyon için kullanıldı.

Ratlar rasgele yöntemle seçilen sekizerli, dört gruba ayrıldı.

1) Negatif kontrol grubu (K) (S=8): Sağlıklı ratlara deneyin 1. gününde 2., 3. ve 4. gruplar ile eşzamanlı olmak üzere 2cc serum fizyolojik intravenöz olarak verildi. Grup 4 ile eşzamanlı olarak 16. ile 30. günler arası 0,1cc serum fizyolojik subkutan olarak yapıldı.

2) Pozitif kontrol grubu (ADR) (S=8): Deneyin birinci gününde 7.5 mg/kg tek doz adriyamin (Adriblastina 10mg flakon, Carlo-Erba İlaç Sanayi) 2cc serum fizyolojik içinde kuyruk veninden enjekte edildi. Deneyin 16. ile 30. günleri arasında 4. grup ile eşzamanlı işlem olarak 0,1 cc serum fizyolojik subkutan yapıldı.

3) Klasik tedavi grubu (PADR) (S=8): Deneyin 1. gününde 7.5 mg/kg tek

doz adriyamisin 2 cc serum fizyolojik içinde kuyruk veninden enjekte edildi. Deneyin 16. ile 30. günleri arasında her gün 5mg/kg prednizolon (Prednisolon ampul, 25mg, Fako) 0,1cc serum fizyolojik içinde intramüsküler olarak yapıldı.

4) **Heparin grubu (HADR) (S=8):** Deneyin 1. gününde 7.5 mg/kg tek doz adriyamisin 2 cc serum fizyolojik içinde kuyruk veninden enjekte edildi. Deneyin 16. ile 30. günleri arasında her gün enoksaparin sodyum (Clexane, 4000 İÜ/40mg/0,4ml, Sanofi Aventis) 2 mg/kg subkutan, 0,1 cc serum fizyolojik içinde yapıldı.

Deney Süresince yapılan İncelemeler

I. Aşama:

- 0. gün ratlar tartıldı, işaretlendi ve metabolik kafese alındı (Resim 3).
- 24 saat süre sonunda her biri tekrar tartıldı, 24 saatlik idrar dışkıdan ayrılmış olarak toplandı, sıvı ve katı gıda alımları ölçüldü.
- Tüm gruptaki ratların her birinden adriyamisin ve serum fizyolojik verilmeden önce kuyruk veninden 1-2 cc kan alındı.
- Alınan kanda üre, kreatinin, albümin, total protein, total kolesterol, trigliserid, glukoz, sodyum, potasyum, kalsiyum ve toplanan 24 saatlik idrarda protein ve kreatinin aynı gün olmak üzere bakıldı.

II. Aşama:

- 2. ve 14. günler arasında ratlar yaşam kafeslerinde izlendi, günlük muayeneleri yapıldı, davranışları gözlemlendi, hasta hayvanlar ayrıldı.

III. Aşama:

- 15. gün ratlar tartıldı ve tekrar 24 saatliğine metabolik kafese alındı.

- 24 saat süre sonunda her biri tekrar tartıldı, 24 saatlik idrar dışkıdan ayrılmış olarak toplandı, sıvı ve katı gıda alımları ölçüldü.
- 16. gün serum fizyolojik, prednizolon veya heparin tedavileri başlanmadan önce kuyruk veninden 1-2 cc kan alındı.
- Alınan kanda üre, kreatinin, albümin, total protein, total kolesterol, trigliserid, glukoz, sodyum, potasyum, kalsiyum ve toplanan 24 saatlik idrarda protein ve kreatinin aynı gün olmak üzere bakıldı.

IV. Aşama:

- 16. ve 30. günler arasında grupların yukarıda belirtilen tedavileri yapıldı.
- Bu süre içinde ratlar yaşam kafeslerinde izlendi, günlük muayeneleri yapıldı, davranışları gözlemlendi, hasta hayvanlar ayrıldı.

V. Aşama:

- 30. gün ratlar tartıldı günlük tedavileri yapıldı ve 24 saatliğine metabolik kafese alındı.
- 24 saat süre sonunda her biri tartıldı, 24 saatlik idrar dışkıdan ayrılmış olarak toplandı, sıvı ve katı gıda alımları takip edildi.
- Derin eter anestezisi altında sakrifikasyon yapıldı.
- Kardiyak ponksiyon ile biyokimyasal parametreler için yaklaşık 2cc kan alındı.
- Alınan kanda üre, kreatinin, albümin, total protein, total kolesterol, trigliserid, glukoz, sodyum, potasyum, kalsiyum ve toplanan 24 saatlik idrarda protein ve kreatinin aynı gün bakıldı bakıldı.
- Her iki böbreğin ekstraksiyonu yapıldı ve %4'lük formol çözeltisine alındı.
- Patoloji laboratuvarında böbreklerden alınan kesitler histopatolojik inceleme için boyandı.



Resim 3. Metabolik rat kafesi.

YÖNTEMLER

Biyokimyasal incelemeler

Ratlara ait serumlar ve idrar örnekleri 1., 16. ve 31. günlerde, örneklerin alındığı gün, Abbott firmasına ait ARCHİTECT otoanalizöründe hazır ticari kitler kullanılarak çalışıldı. Serumların glukoz düzeyleri hegzokinaz enzimi kullanılarak, total protein biüret yöntemine göre, albumin bromkrezol green kullanılarak, üre (BUN) üreaz enzimi kullanılarak Talke ve Shubert yönteminin modifikasyonu ile, kreatinin Alkalen Pikrat yöntemi, kalsiyum Arsenazo III kullanılarak, total kolesterol ve triglserid enzimatik olarak, sodyum ve potasyum ise iyon selektif elektrodlar kullanılarak saptandı (108-111).

Sıçanların 24 saatlik idrar örnekleri metabolik kafeste toplandıktan sonra 1/10 oranında sulandırılarak kreatinin (112) düzeyi, benzetonium klorür kullanılarak

ise idrar protein düzeyi türbidimetrik olarak saptandı (108). Sonuçlar mg/ 24 saat olarak verildi.

Histopatoloji

Böbreklerin histopatolojik değerlendirilmeleri böbrek patolojisinde deneyimli bir patolog tarafından kör yöntemle yapıldı. Doku örnekleri %4 nötral tamponlu formalinde 24 saat fikse edildi. Parafin bloklar hazırlandı. Bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin-eosin ile boyandı. Örnekler ışık mikroskopu ile incelendi. Histopatolojik skorlama semikantitatif olarak 20 glomerül üzerinden yapıldı (113). Hazırlanan preparatlar glomeruloskleroz, glomerülde fokal nekroz, glomerüler konjesyon, Bowman kapsül aralığında genişleme, tübül epitelinde dejenerasyon, tübül epitelinde nekroz, tübüllerde dilatasyon, interstisyel bölgede inflamasyon, damar duvarında kalınlaşma, interstisyel fibrozis yönleri ile değerlendirildi.

Skorlamada histopatolojile; bulgu yok=0; hafif bulgu= (+); orta= (++) ; şiddetli= (+++) olarak derecelendirildi.

Kollajen III ile immunhistokimyasal boyama:

İmmunhistokimyasal boyama Avidin-Biyotin kompleks sistemi (ABC) kullanılarak yapıldı. Bu yöntem için bloklardan hazırlanan 4µm kalınlığındaki kesitler poli-L-lysin (MicroSlides Snowcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA) kaplı lamlara alınarak oda ısısında bekletildi. Poly-L-lysin kaplı lama alınan kesitler bir gece 37 derecelik etüvde bekletildikten sonra 2-30 dakika 56 derecelik etüvde bulanana ksilolde, 15 dakika oda sıcaklığındaki ksilolde deparafinize edildi. Azalan oranlarda alkol serilerinde rehidrate edildi ve kesitler önceden hazırlanmış olan

pH:7.2 olan phosphate-buffered-saline(PBS) solüsyonunda beş dakika bekletildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilebilmesi için, kesitlere %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılarak beş dakika bekletildi, daha sonra beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı. Sitrat Buffer (pH:6.0) solüsyon dolu kaplara yerleştirilerek mikrodalga fırında 750 watt'da beş dakika, 500 watt'da 2x5 dakika süre ile inkübasyon işlemi yapıldı. Böylece antijenin açığa çıkarılması sağlandı.

Kaynatmadan sonra kesitler oda ısısında soğumaya bırakıldı, beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı. Herbir kesitin üzerine primer antikor solüsyonu (Collagen III, 1/250 dilüsyonda, AbD Serotec, Oxford, UK) dokuyu tamamen örtecek şekilde damlatıldı ve bir saat bekletildi. Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkanarak bağlanmış antikorlar uzaklaştırıldı. Biotine bağlayıcı sekonder antikor eklendi ve 10 dakika bekletildikten sonra beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı. Kesitlere Streptavidin Peroksidaz solüsyonu damlatılarak 10 dakika beklendi, arkasından beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı. Renk verecek görüntüyü sağlamak amacı ile Diaminobenzidin tetraklorid (DAB), damlatıldı ve kahverenk gözlenene kadar bekletildi. Çeşme suyunda beş dakika yıkandı. Zemin boyanması için kesitlere hematoksilin ile zıt boyama yapıldı. Çeşme suyunda beş dakika yıkandı. Dehidratasyon için kesitler sırası ile yükselen oranlarda alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde saydamlaştırma sonrası balsam ile kaplandı.

Pozitif kontrol internal vasküler yapılarıdaki boyanma, negatif kontrol ise primer antikor yerine PBS solüsyonu damlatılarak yapıldı. Boyanma aşamasında sonra kesitler ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japan) altında 4, 10, 20 ve 40'lük büyütme oranlarında incelendi.

En yoğun boyanma gözlenen alanlarda semikantitatif bulgu yok=0; hafif bulgu= (+); orta= (++); şiddetli= (+++) olarak derecelendirildi.

İstatistik

Tüm veriler SPSS 13.0 programına girilerek istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arası farkların karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Homojen dağılımı olan gruplarda Tukey HSD testi, non-homojen gruplar için Tamhane testi kullanıldı. Zamana göre grupların çoklu karşılaştırmalarında ise iki yönlü varyans analizi kullanıldı, homojen gruplar Tukey HSD, non- homojen gruplar Tamhane testleri ile değerlendirildi. Histopatolojik verilerin karşılaştırılmasında Pearson ki-kare testi kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi, $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

B U L G U L A R

Ratların günlük bakımları sırasında hasta görünümlü olanlar ve ölenler diğerlerinden ayrıldı. Deneklerin adriyamisin enjeksiyonundan sonra ikinci haftada genel durumlarında ve beslenmelerinde bozulma gözlemlendi. ADR, PADR ve HADR gruplarında dördüncü haftada ikişer rat kaybedildi. Kontrol grubunda bir rat deney başında eter anestezisi altındayken kaybedildi, bir rat da kafesten kurtulduğu için deney tüm gruplarda altışar rat ile tamamlandı. Sonuçlar 1., 16. ve 31. günler olarak aşağıda verilmiştir.

Vücut ağırlıkları:

1. Gün: Başlangıç ağırlıkları arasında her dört grup arasında fark yoktu.

16.Gün: Her üç gruptaki ratların ağırlıkları kontrol grubuna göre anlamlı düşüktü ($p=0,000$ ADR, PADR ve HADR için). ADR, PADR ve HADR grupları arasında fark yoktu.

31.Gün: ADR, PADR ve HADR gruplarında kontrol grubundaki ratların ağırlıklarına göre anlamlı düşüklük vardı ($p=0,000$ ADR, PADR ve HADR için). ADR, PADR ve HADR grupları arasında fark yoktu (Tablo 3).

Tablo 3. Gruplardaki ratların zaman içinde ağırlık değişimleri.

Grup	1. gün ağırlık (gr)	16. gün ağırlık (gr)	31. gün ağırlık (gr)
ADR	206,3 ± 16,0	181,0 ± 7,7	152,5 ± 8,0
PADR	207,3 ± 7,8	177,5 ± 17,2	148,0 ± 10,8
HADR	208,3 ± 12,3	180,8 ± 8,0	159,3 ± 9,7
Kontrol	209,2 ± 14,1	273,3 ± 32,6	318,8 ± 28,5

ADR, PADR ve HADR gruplarında 1. gün ile karşılaştırıldığında 16. ve 31. gün ağırlıkları anlamlı olarak daha düşüktü ($p=0,000$ ADR, PADR ve HADR için).

24 saatlik idrar miktarları:

1. Gün 24 saatlik idrar miktarları: Gruplar arasında fark yoktu.

16. Gün 24 saatlik idrar miktarları: Adriyamisin enjeksiyonundan 2 hafta sonra olan 16. gün 24 saatlik idrar miktarı her üç grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p=$ ADR: 0,000, PADR: 0,001, HADR: 0,000). HADR grubunun ise 16. gün 24 saatlik idrar miktarı ADR grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p=0,046$), diğer gruplar arasında fark yoktu.

31. Gün 24 saatlik idrar miktarları: Üç grubun idrar miktarları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=$ ADR:0,000, PADR:0,023, HADR:0,000). PADR grubunda ADR ve HADR gruplarına göre anlamlı olarak idrar miktarı daha düşüktü ($p=$ ADR:0,008, HADR:0,009), diğer ikisi arasında anlamlı fark yoktu. (Tablo 4).

Tablo 4. Grupların zaman içindeki 24 saatlik idrar miktarları

Grup	1. gün idrar (ml)	16. gün idrar (ml)	31. gün idrar (ml)
ADR	3,6 ± 0,9	17,0 ± 7,8	20,8 ± 4,7
PADR	2,9 ± 1,0	10,5 ± 3,8	10,0 ± 3,0
HADR	3,8 ± 0,8	9,7 ± 1,7	17,5 ± 3,0
Kontrol	3,7 ± 1,2	3,0 ± 0,6	4,1 ± 1,3

Kontrol grubundaki ratların idrar miktarları zaman içinde sabit kaldı. ADR, PADR ve HADR grubundaki ratlarda 1. gün ile karşılaştırıldığında 16. ($p= 0,009$;

0,000; 0,002) ve 31. (p= 0,002; 0,000, 0,000) gün idrar miktarlarındaki artış anlamlı bulundu. 16. ve 31.günler arasında fark ADR ve PADR gruplarında anlamlı bulunmadı, HADR grubunda anlamlıydı (p=0.000).

Ratların 24 saat içindeki sıvı alımları açısından:

1. Gün: Gruplar arası sıvı tüketimi açısından fark saptanmadı.

16. Gün: Gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmadı.

31. Gün: Gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmadı (Tablo 5).

Tablo 5. Grupların 24 saatlik sıvı alımları.

Grup	1. gün sıvı (ml)	16. gün sıvı (ml)	31. gün sıvı (ml)
ADR	26,5 ± 1,4	34,3 ± 6,2	27,2 ± 8,1
PADR	26,8 ± 2,1	35,7 ± 9,4	28,0 ± 6,9
HADR	26,8 ± 2,9	36,2 ± 6,3	23,8 ± 4,5
Kontrol	26,0 ± 3,5	28,8 ± 0,8	25,5 ± 3,1

Kan kreatinin düzeyleri:

1. Gün: Kan kreatinin düzeyleri arasında gruplar arasında fark bulunmadı.

16. Gün: Kan kreatinin düzeyleri arasında gruplar arasında fark bulunmadı.

31 Gün: Her üç grubun kan kreatinin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu (p= ADR:0,009, PADR:0,010, HADR:0,043). ADR, PADR v HADR grupların arasında fark yoktu (Tablo 6).

Tablo 6. Grupların kan kreatinin düzeyleri

Grup	1. gün kreatin (mg/dl)	16. gün kreatin (mg/dl)	31. gün kreatin (mg/dl)
ADR	0,53 ± 0,05	0,53 ± 0,10	0,40 ± 0,00
PADR	0,54 ± 0,05	0,53 ± 0,08	0,42 ± 0,04
HADR	0,55 ± 0,05	0,48 ± 0,08	0,43 ± 0,05
Kontrol	0,53 ± 0,05	0,57 ± 0,05	0,53 ± 0,05

Kan kreatinin düzeyleri 1.gün ile kıyasla diğer günlerde kontrol grubunda sabit kaldı. ADR, PADR ve HADR gruplarında 1. gün ile karşılaştırıldığında 31. gün anlamlı düşme saptandı (p= 0,020; 0,046; 0,033). ADR ve PADR gruplarında 16. günde de anlamlı düşme vardı (p= 0,020; 0,046). ADR grubunda 16. gün ile karşılaştırıldığında 31. günde anlamlı düşme (p=0,020) bulundu.

Kan üre düzeyleri:

1. Gün: Kan üre düzeyleri arasında gruplar arasında fark bulunmadı.

16. Gün: Kan üre düzeyleri arasında gruplar arasında fark bulunmadı.

31. Gün: Kan üre değerleri ADR ve PADR gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,008, 0,007), HADR 31. gün kan üre düzeyi ADR, PADR ve kontrol gruplarından farklı değildi (Tablo 7).

Tablo 7. Grupların kan üre düzeyleri.

Grup	1. gün üre (mg/dl)	16. gün üre (mg/dl)	31. gün üre (mg/dl)
ADR	40,8 ± 9,2	40,6 ± 18,2	57,2 ± 12,4
PADR	35,5 ± 9,2	44,5 ± 5,9	47,7 ± 8,5
HADR	39,7 ± 7,2	44,3 ± 7,7	44,0 ± 10,6
Kontrol	41,5 ± 7,4	38,5 ± 4,1	28,2 ± 5,4

Kan üre düzeyinde zaman içindeki fark ADR ve HADR gruplarında anlamlı bulunmadı. PADR grubunda 1. güne göre 31. gün değerleri yüksekti (p=0,018), diğer gün değerleri arasındaki farklar anlamlı bulunmadı.

Kan total protein düzeyleri:

1. Gün: Gruplar arasında kan total protein düzeyleri arasında fark bulunmadı.

16. Gün: Kan protein düzeyleri her üç grupta kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu (p=0,000, ADR, PADR ve HADR için).

31. Gün: Kan protein değerleri her üç grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı (p=0,008, 0,007). HADR grubunun 31. gün kan protein düzeyi PADR grubundan daha düşüktü (p=0,027). HADR ile ADR grupları ve PADR ile ADR grupları arasında fark yoktu (Tablo 8).

Tablo 8. Grupların zaman içinde serum protein değerleri.

Grup	1. gün protein (gr/dl)	16. gün protein (gr/dl)	31. gün protein (gr/dl)
ADR	7,0 ± 0,44	4,8 ± 0,47	4,4 ± 0,60
PADR	6,9 ± 0,48	5,2 ± 0,52	4,7 ± 0,67
HADR	6,9 ± 0,49	4,1 ± 0,18	3,8 ± 0,19
Kontrol	6,8 ± 0,31	6,9 ± 0,32	6,9 ± 0,20

ADR, PADR ve HADR gruplarında 1. güne göre 16. ve 31. günlerdeki protein düzeyleri anlamlı düşüktü ($p=0.000$ tüm gruplar için), 16. ve 31. günlerdeki fark anlamlı bulunmadı.

Kan albümin düzeyleri:

1. Gün: Gruplar arasında kan albümin düzeyleri arasında fark bulunmadı.

16. Gün: Her üç grubun kan albümin düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0,000$, ADR, PADR ve HADR için). Diğer grupların kendi arasında farkı yoktu.

31. Gün: Her üç grubun kan albümin düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0,000$, ADR, PADR ve HADR için). Diğer grupların kendi arasında farkı yoktu (Tablo 9).

Tablo 9. Grupların serum albümin düzeyleri.

Grup	1. gün albümin (gr/dl)	16. gün albümin (gr/dl)	31. gün albümin (gr/dl)
ADR	4,0 ± 0,36	1,9 ± 0,34	1,9 ± 0,23
PADR	4,0 ± 0,16	1,9 ± 0,39	1,7 ± 0,19
HADR	4,0 ± 0,14	2,0 ± 0,18	1,8 ± 0,18
Kontrol	3,9 ± 0,14	3,9 ± 0,23	4,1 ± 0,16

ADR, PADR ve HADR gruplarında albümin 1. gün değerlerine göre 16. ve 31. günlerinde düşüktü (p=0,000 tüm gruplarda).

Kan trigliserid düzeyleri:

1. Gün: Gruplar arasında kan trigliserid düzeyleri arasında fark bulunmadı.

16. Gün: Trigliserid düzeyleri üç grupta da kontrol grubundan anlamlı yüksek bulundu (p= ADR:0,000, PADR:0,028 ve HADR:0,016). Grupların arasında anlamlı farkı yoktu.

31. Gün: Trigliserid düzeyleri PADR ve HADR gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p= 0,028; 0,032). Diğer gruplar arasında fark yoktu (Tablo 10).

Tablo 10. Grupların kan trigliserid düzeyleri.

Grup	1. gün trigliserid (mg/dl)	16. gün trigliserid (mg/dl)	31. gün trigliserid (mg/dl)
ADR	67,2 ± 13,0	731,7 ± 98	848 ± 496
PADR	76,3 ± 10,7	709 ± 316	1471 ± 691
HADR	70,5 ± 11,8	621 ± 240	1376 ± 665
Kontrol	60,3 ± 11,8	85,2 ± 11,0	103 ± 28

ADR, PADR ve HADR gruplarında trigliserid 1. gün değerlerine göre 16. (p= 0,005; 0,013; 0,046) ve 31. (p= 0,002; 0,013; 0,000) günlerde anlamlı olarak yüksek bulundu.

Kan total kolesterol düzeyleri:

1. Gün: Gruplar arasında total kolesterol düzeyleri arasında fark bulunmadı.

16. Gün: Kolesterol düzeyleri üç grupta da kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (p= ADR:0,048, PADR:0,003 ve HADR:0,021). Diğer grupların arasında anlamlı fark yoktu.

31. Gün: Üç grubun da kolesterol düzeyleri kontrol grubundan anlamlı yüksek bulundu (p= ADR:0,007, PADR:0,001 ve HADR:0,006). Diğer grupların arasında anlamlı fark yoktu (Tablo 11).

Tablo 11. Grupların kan total kolesterol değerleri.

Grup	1. gün kolesterol (mg/dl)	16. gün kolesterol (mg/dl)	31. gün kolesterol (mg/dl)
ADR	69,5 ± 9,7	353 ± 170	383 ± 120
PADR	63,0 ± 5,9	265 ± 66	338 ± 66
HADR	62,0 ± 10,2	264 ± 98	408 ± 125
Kontrol	68,0 ± 9,4	58,5 ± 8,8	63,5 ± 11,8

ADR, PADR ve HADR gruplarında kolesterol değerleri 16. (p=0,001; 0,000; 0,002) ve 31. (p= 0,000 tüm gruplar için) gün değerleri birinci güne göre anlamlı olarak yüksek bulundu. 16. ve 31. günler arası fark saptanmadı.

Kan sodyumu (Na):

1. Gün: Gruplar arasında kan sodyum düzeyleri arasında fark bulunmadı.

16. Gün: ADR ve HADR gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düşüktü ($p=$ ADR:0,022, HADR:0,012), PADR grubu ile fark yoktu. Diğer grupların kendi arasında anlamlı fark yoktu.

31. Gün: Gruplar arasında kan sodyum düzeyleri arasında fark bulunmadı (Tablo 12).

Tablo 12. Grupların kan sodyum değerleri.

Grup	1. gün Na (mEq/L)	16. gün Na (mEq/L)	31. gün Na (mEq/L)
ADR	139,3 ± 2,7	140,6 ± 1,7	144,0 ± 2,5
PADR	140,2 ± 2,6	141,6 ± 2,1	141,6 ± 4,5
HADR	140,6 ± 3,2	140,3 ± 2,7	141,2 ± 2,0
Kontrol	140,6 ± 1,7	144,3 ± 1,0	143,3 ± 1,6

ADR grubunun 1. ve 16. gün sodyum değerleri 31. günden anlamlı düşüktü ($p=0,002, 0,017$). 1. ve 16. gün değerleri arasında fark bulunmadı. PADR ve HADR grupları arasında fark yoktu.

Kan potasyumu (K^+):

1. Gün: PADR grubunun kan potasyum düzeyleri kontrol grubunda yüksekti ($p=,036$), diğer gruplar arasında farklılık bulunmadı.

16. Gün: Gruplar arasında potasyum düzeyleri arasında fark bulunmadı.

31. Gün: Her üç grubun potasyumu kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p=$ ADR:0,005, PADR:0,003 ve HADR:0,004). Diğer gruplar arasında anlamlı fark yoktu (Tablo 13).

Tablo 13. Grupların günlere göre kan potasyumu.

Grup	1. gün K ⁺ (mEq/L)	16. gün K ⁺ (mEq/L)	31. gün K ⁺ (mEq/L)
ADR	5,6 ± 1,0	6,6 ± 1,9	4,7 ± 0,3
PADR	6,5 ± 1,4	6,7 ± 1,3	4,6 ± 0,3
HADR	5,8 ± 1,1	6,1 ± 1,2	4,6 ± 0,1
Kontrol	4,7 ± 0,3	6,5 ± 0,8	6,0 ± 1,1

Kan kalsiyumu (Ca):

1. Gün: PADR grubunun kan kalsiyum düzeyleri kontrol grubundan anlamlı düşük bulundu (p=0,021), diğer gruplar arasında farklılık bulunmadı.

16. Gün: Her üç grubun kalsiyum düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulundu (p= ADR:0,000, PADR:0,000 ve HADR:0,003). Diğer gruplar arasında fark yoktu.

31. Gün: Her üç grubun da kan kalsiyum düzeyleri kontrol grubundan düşük bulundu (p= ADR:0,001, PADR:0,000 ve HADR:0,000). Diğer gruplar arasında anlamlı fark yoktu (Tablo 14).

Tablo 14. Grupların kan kalsiyum değerleri.

Grup	1. gün Ca (mg/dl)	16. gün Ca (mg/dl)	31. gün Ca (mg/dl)
ADR	9,2 ± 0,4	7,7 ± 0,5	8,1 ± 0,4
PADR	8,8 ± 0,4	7,7 ± 0,6	7,7 ± 0,4
HADR	9,1 ± 0,3	8,2 ± 0,4	7,7 ± 0,3
Kontrol	9,4 ± 0,3	9,3 ± 0,2	9,0 ± 0,3

ADR, PADR ve HADR gruplarında kalsiyum 16. gün ve 31. gün değerleri 1. günden anlamlı düşük bulundu ($p=0,000; 0,010; 0,002$). 16. ve 31. günler arası fark saptanmadı.

Kan glüközü:

1. Gün: Gruplar arasında farklılık bulunmadı.

16. Gün: Her üç grubun glüköz düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulundu ($p= \text{ADR:}0,000, \text{PADR:}0,000$ ve $\text{HADR:}0,000$). Diğer gruplar arasında fark bulunmadı.

31. Gün: Üç grubun da glüköz düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulundu ($p= \text{ADR:}0,000, \text{PADR:}0,000$ ve $\text{HADR:}0,000$). Diğer gruplar arasında fark bulunmadı (Tablo 15).

Tablo 15. Grupların zamana göre kan glüköz değerleri.

Grup	1. gün glüköz (mg/dl)	16. gün glüköz (mg/dl)	31. gün glüköz (mg/dl)
ADR	124,8 ± 9,1	83,0 ± 10,4	70,3 ± 9,5
PADR	136,7 ± 4,4	72,7 ± 18,3	63,3 ± 9,5
HADR	125,5 ± 7,3	69,3 ± 9,8	62,8 ± 6,9
Kontrol	144,7 ± 20,6	122,2 ± 8,4	124,0 ± 8,7

ADR, PADR ve HADR gruplarında kan glüköz 16. gün ve 31. gün değerleri birinci günden anlamlı düşük bulundu ($p=0,000$ tüm gruplarda). 16. ve 31. günler arası fark saptanmadı.

24 saatlik idrar protein düzeyi (U-protein):

1. Gün: Gruplar arasında farklılık bulunmadı.

16. Gün: ADR, PADR ve HADR grupların 24 saatlik idrar protein düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (p= ADR:0,004, PADR:0,045 ve HADR:0,035). Diğer gruplar arasında fark bulunmadı.

31. Gün: Her üç grubun 24 saatlik idrar protein düzeyleri kontrol grubundan yüksek bulundu (p= ADR:0,034, PADR:0,015 ve HADR:0,035). Diğer gruplar arasında fark bulunmadı (Tablo 16).

Tablo 16. Zaman içinde idrar 24 saatlik protein değerleri.

Grup	1. gün U-protein (mg/dl)	16. gün U-protein (mg/dl)	31. gün U-protein (mg/dl)
ADR	173,3 ± 44,4	4574 ± 2857	3364 ± 1603
PADR	169,5 ± 23,8	2067 ± 1373	3772 ± 1979
HADR	137,3 ± 43,5	3462 ± 2094	2668 ± 2691
Kontrol	146,3 ± 27,1	201,7 ± 25,1	176,2 ± 87,9

ADR, PADR ve HADR gruplarında 16. (p= 0,001; 0,000; 0,000) ve 31. (p= 0,004; 0,000; 0,000) gün 24 saatlik idrar protein değerleri birinci gün değerlerinden anlamlı yüksek bulundu. 16. ve 31. günler arası fark saptanmadı.

İdrar 24 saatlik kreatinin düzeyi (U-üre):

1. Gün: Gruplar idrar kreatinin değerleri arasında farklılık bulunmadı.

16. Gün: Üç grubun idrar kreatinin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (p= ADR:0,011, PADR:0,005 ve HADR:0,007). Diğer gruplar arasında fark bulunmadı.

31. Gün: ADR, PADR ve HADR grupların idrar kreatinin düzeyleri kontrol grubundan anlamlı düşük bulundu (p= ADR:0,001, PADR:0,002 ve HADR:0,002). Diğer gruplar arasında fark bulunmadı (Tablo 17).

Tablo 17. Grupların 24 saatlik idrar protein değerleri

Grup	1.gün U-kreatin (mg/dl)	16. gün U-kreatin (mg/dl)	31. gün U-kreatin (mg/dl)
ADR	109 ± 21	43 ± 29	23 ± 14
PADR	119 ± 23	26 ± 16	23 ± 9
HADR	100 ± 25	25 ± 11	26 ± 11
Kontrol	129 ± 20	136 ± 43	141 ± 37

ADR, PADR ve HADR gruplarında 16. (p= 0,004; 0,000; 0,000) ve 31. günler (p= 0,001; 0,000; 0,000) idrar kreatinin değerleri birinci günden anlamlı düşük bulundu. 16. ve 31. günler arası fark saptanmadı.

Gruplar arasında histopatolojik skora

Sakrifikasyon ile bir ratın her iki böbreği çıkarıldı ve kodlanarak aynı kaba konuldu. ADR grubundaki ratların böbreklerinin kontrol grubuna göre soluk, sert kıvamlı ve daha küçük boyutta oldukları gözlemlendi. PADR ve HADR grupların böbrekleri görünüm olarak nispeten kontrol grubundaki ratların böbreklerine benzemektedir. Böbrek dokusunun histopatolojik değerlendirmelerinde elde edilen semikantitatif skora sonuçları Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18. Gruplara göre semikantitatif histopatolojik skorlama sonuçları.

Grup	Glom skleroz	Glom fokal nekroz	Glom konjesy	Damar duvar kalınlaş	Bowman aralığında genişleme	Tübül epitel dejener	Tübül epitel nekroz	Tübüler dilatasy	İnterst inflam	İnterst fibroz	Kol III birik
K1	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+
K2	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0
K3	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+
K4	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
K5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K6	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+
ADR1	0	++	++	+	++	+++	+	+++	++	+	++
ADR2	0	+	+	0	+	++	+	++	++	0	+
ADR3	0	+	++	0	+	++	0	++	++	0	++
ADR4	0	+	++	0	+	++	+	++	+	0	++
ADR5	0	++	++	+	++	+	0	++	0	+	++
ADR6	0	++	++	0	++	+	0	++	+	0	++
PADR1	0	0	0	0	0	+	0	+	+	0	+
PADR2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
PADR3	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+
PADR4	0	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0
PADR5	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+
PADR6	0	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+
HADR1	0	+	++	+	+	+	0	+	+	0	0
HADR2	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	+
HADR3	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+
HADR4	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	0
HADR5	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+
HADR6	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+

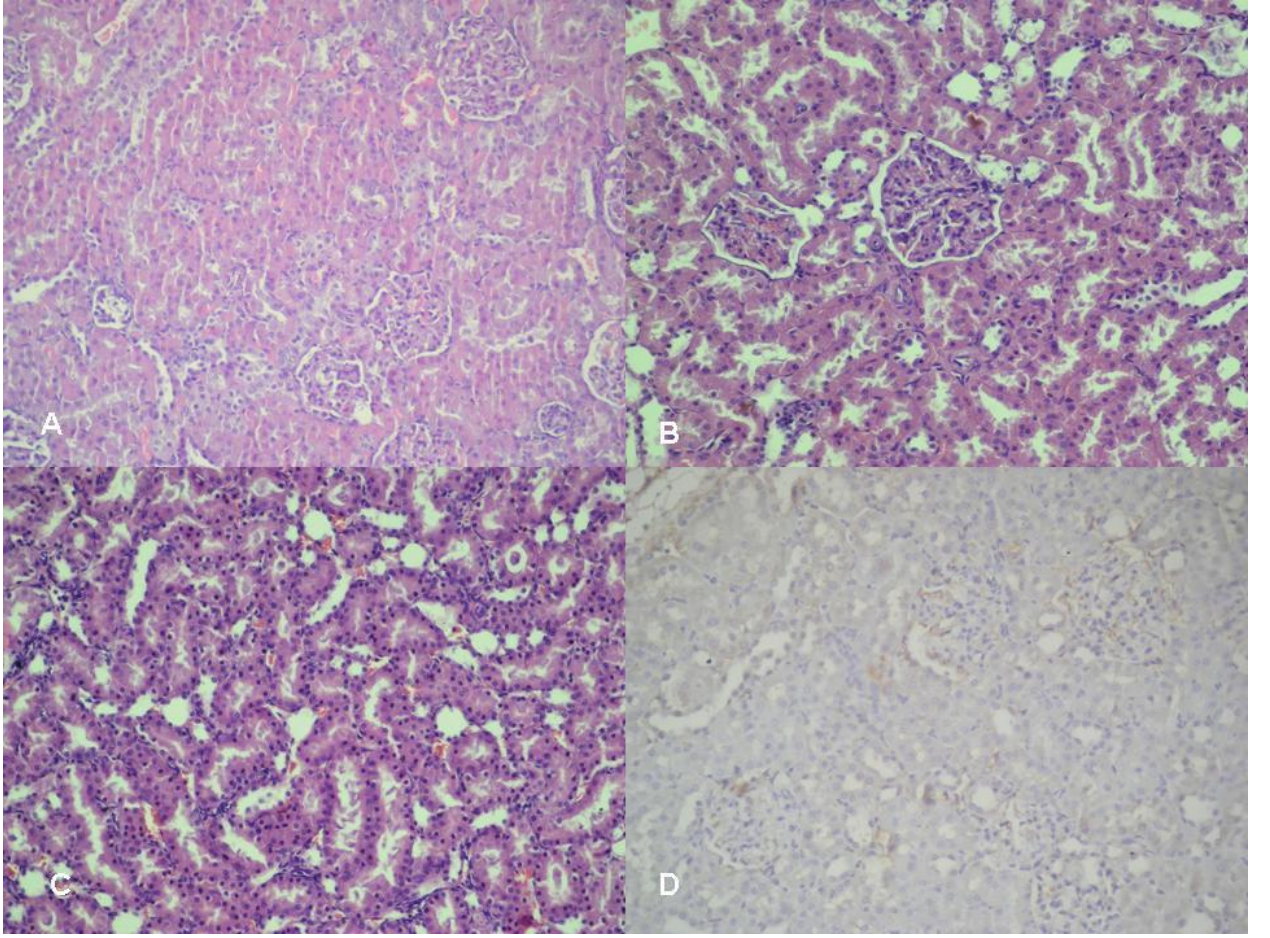
* (0) : lezyon yok; (+) : hafif; (++) : orta; (+++) : şiddetli.

Glomerüler skleroz hiçbir grupta oluşmadı. Glomerülde fokal nekroz bulgusu, ADR grubunda kontrol, PADR ve HADR grupları ile kıyaslandığında anlamlı olarak daha yüksek oranda oluştu ($p=0,006$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Glomerülde konjesyon ADR grubunda diğer dört gruba göre daha yüksek bulundu ($p=0,002$), kontrol, PADR, HADR grupları arasında anlamlı bir fark yoktu. Kapiller duvar kalınlaşması açısından gruplar arasında fark yoktu ($p=0,217$).

Bowman kapsülü aralığında genişleme ADR grubunda anlamlı olarak daha yüksek oranda oluştu ($p=0,006$), diğer gruplar arasında fark yoktu.

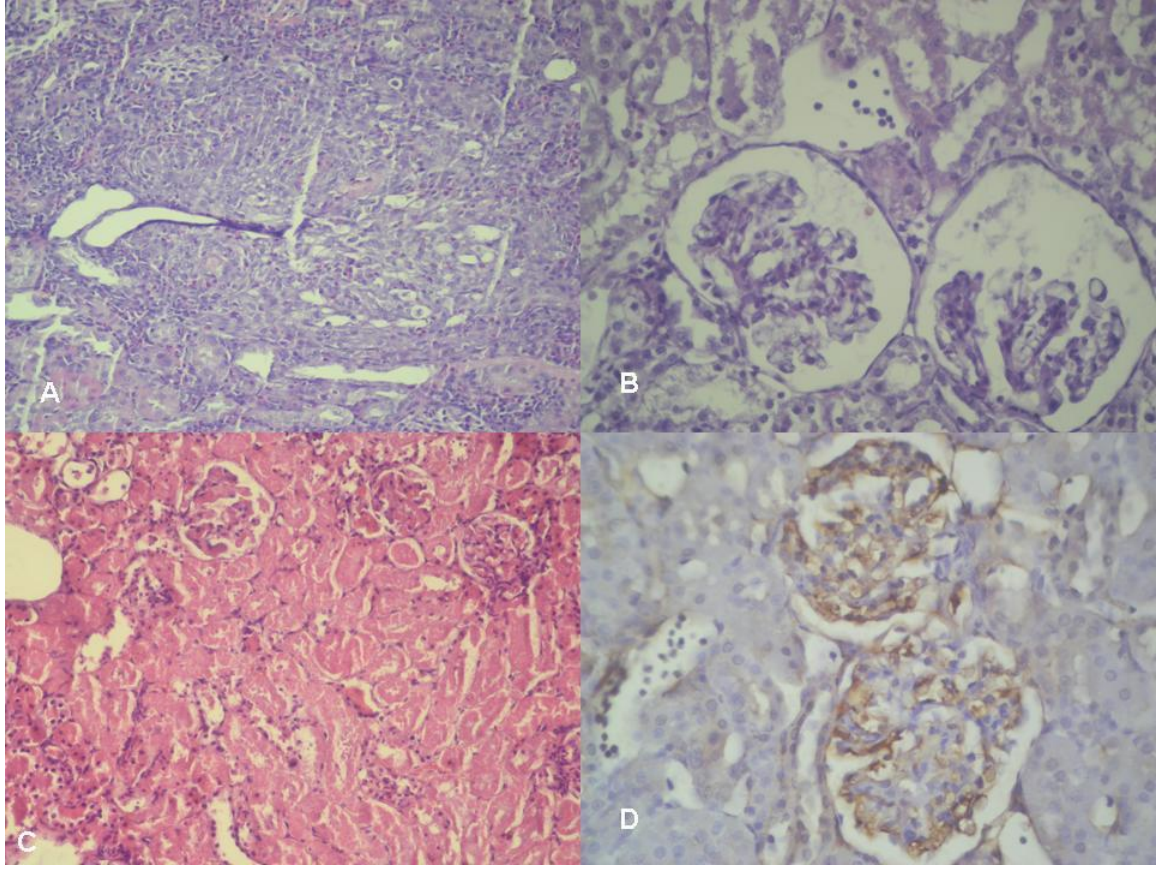
Tübül epitelinde dejenerasyon ADR grubunda anlamlı fazlaydı ($p=0,002$), diğer gruplar arasında fark saptanmadı. Tübül epitelinde nekroz ADR grubunda yüksek oranda ($p=0,026$) bulunurken diğer gruplar arasında farklılık yoktu. Tübüler epitelde genişleme ADR grubunda anlamlı olarak fazla saptandı ($p=0,001$). İnterstisyel alana hücre infiltrasyonu açısından dört grup arasında farklılık yoktu ($p=0,078$). İnterstisyel fibrozis ADR grubundaki 2 ratta hafif (+1) oluştu ancak istatistiksel olarak farklılık bulunmadı ($p=0,217$).

Mezangiyal kollajen III birikimi ADR grubunda anlamlı yüksekti ($p=0,000$), diğer gruplarda fark yoktu (Resim 4, 5, 6 ve 7).



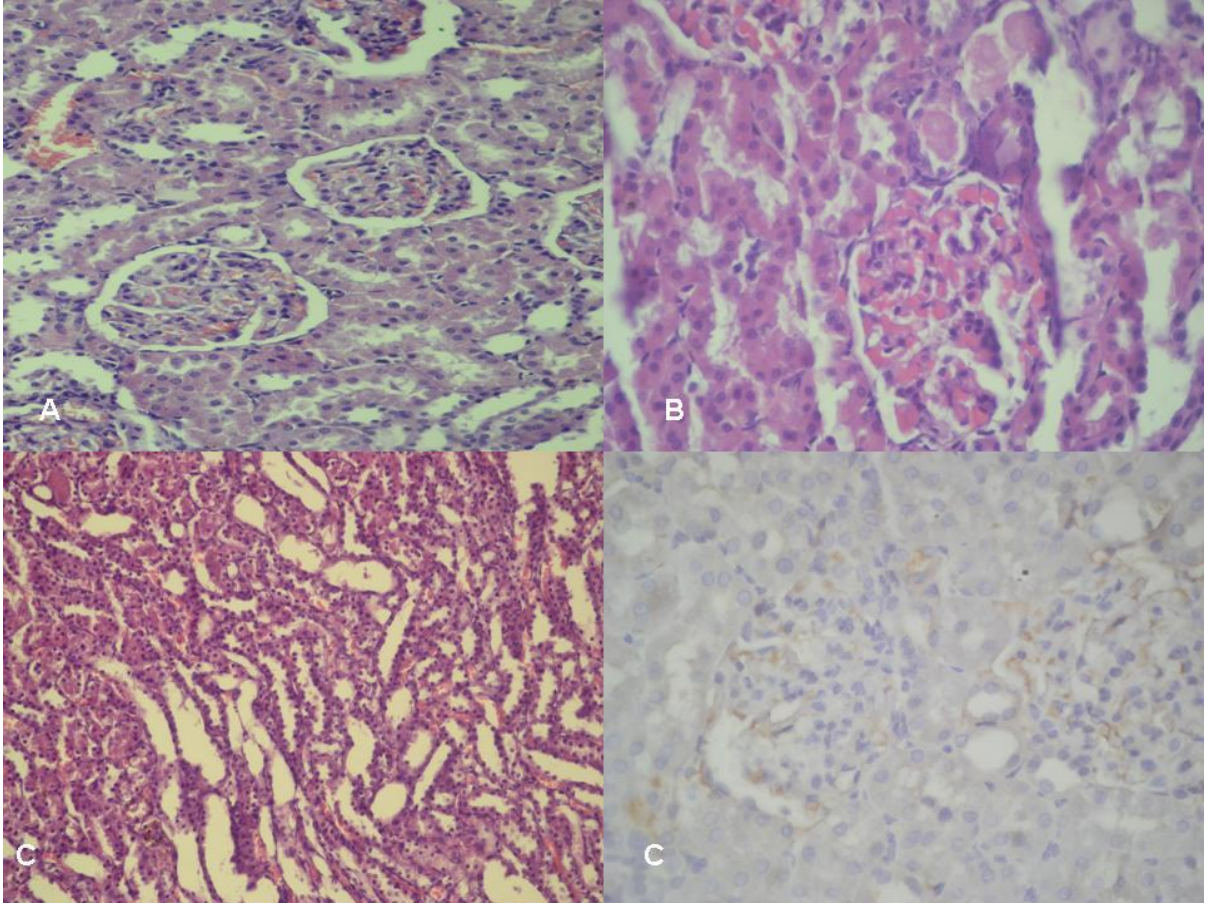
Resim 4. Sağlıklı-kontrol grubu ratlarda en yoğun patolojinin olduğu örnekler.

A: Normal görünüm (HE x 100); B: Minimal konjesyon bulguları gösteren glomerüller (HE x 200); C: Minimal dilatasyon bulguları içeren tübül yapıları (HE x 200); D:Kollajen III boyasında glomerül damar yapılarında zayıf boyanma (anti-kollajen III x 200).



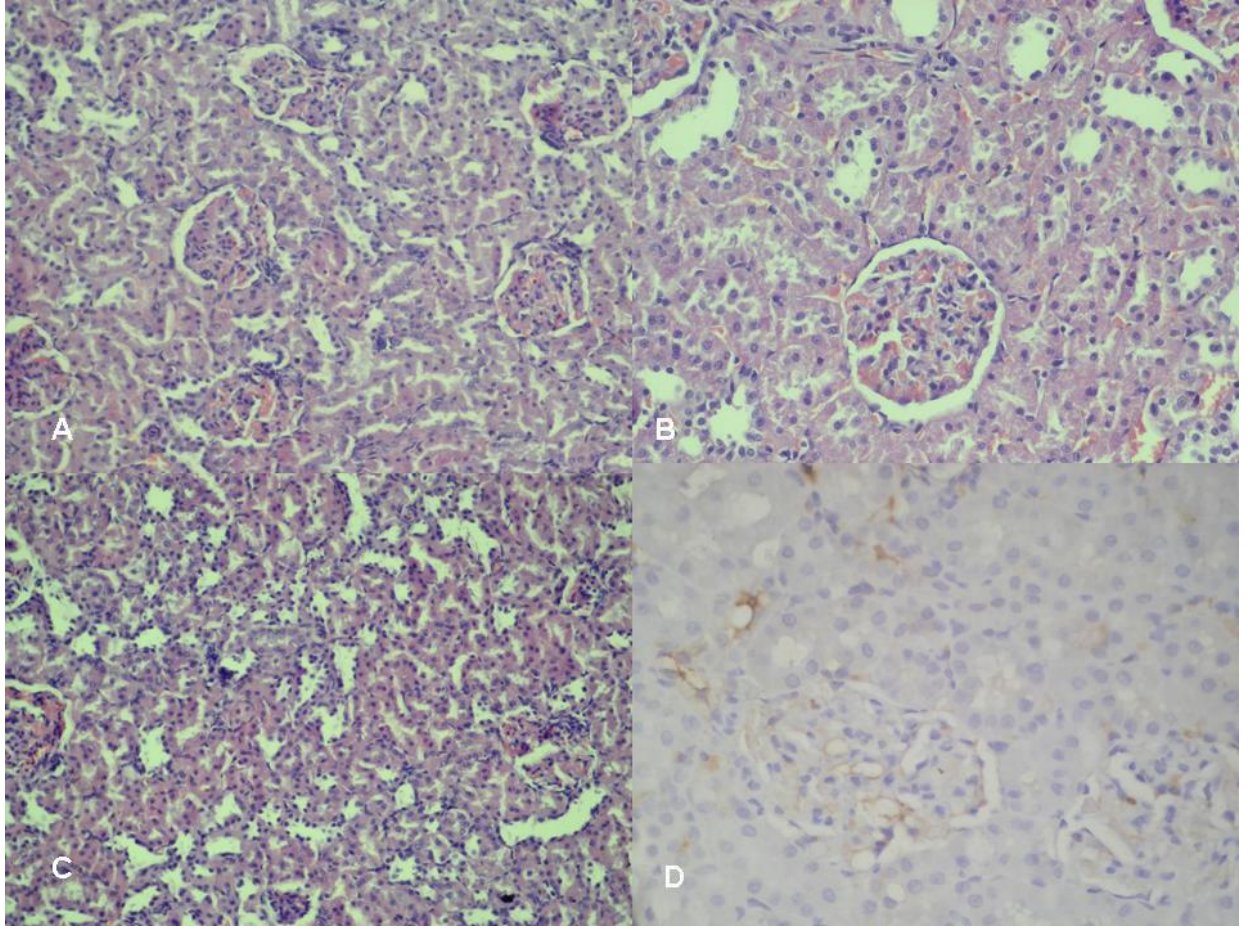
Resim 5. ADR grubu ratlarda en yoğun patolojinin olduğu örnekler.

A: Belirgin interstisyel inflamasyon, tübül kaybı alanları (HE x 100); B: Glomerüllerde Bowman kapsülü aralığında genişleme, fokal nekroz bulguları (HE x 200); C: tübüllerde nekroz, glomerüllerde konjesyon bulguları (HE x 100); D: İmmünohistokimyasal kollajen III boyasında glomerül duvarında diffüz şiddetli tutulum (anti-kollajen III x 200).



Resim 6. PADR grubu ratlarda en yoğun patolojinin olduğu örnekler.

A: Glomerüllerde hafif konjesyon ve tübüllerde hafif dilatasyon bulguları (HE x 100); B: Glomerüler konjesyon B (HE x 200); C: Tübüllerde dilatatasyon (HE x 100); D: İmmünohistokimyasal kollajen III boyasında glomerül duvarında hafif boyanma D (anti-kollajen III x 200).



Resim 7. HADR grubu ratlarda en yoğun patolojinin olduğu örnekler.

A: Glomerüllerde konjesyon, Bowman kapsül aralığında hafif genişleme (HE x 100); B: Tübülde hafif dilatasyon ve glomerüllerde hafif konjesyon alanları (HE x 200); C: Tübülde hafif tübüler dilatasyon bulguları (HE x 200); D: İmmünohistokimyasal kollajen III boyasında glomerül duvarında hafif derecede boyanma (anti-kollajen III x 200).

TARTIŞMA

FSGS kronik böbrek yetmezliğine yol açtığı için tedavisi önemlidir. Ancak mevcut tedaviler ile iyileşme oranları düşüktür. Kullanılan tedavilerin yan etkileri yüksektir. Düşük molekül ağırlıklı heparinler ile yapılan değişik çalışmalarda antiproliferatif, antifibrotik ve antienflamatuvar etkileri bildirilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada adriyamisinle FSGS oluşturulan ratlarda heparinlerin etkisi, prednizolon tedavisi ile de karşılaştırılarak araştırılmıştır.

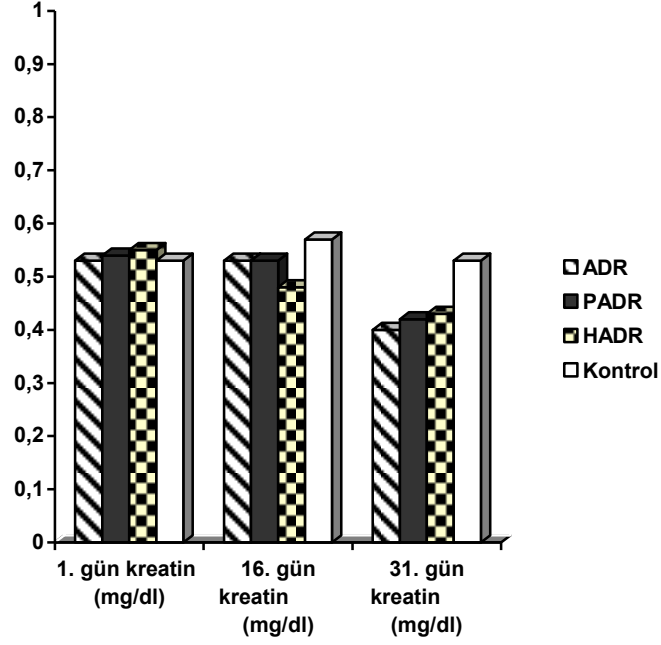
Deneklerin adriyamisin etkisi altında ağırlık kayıpları ve idrar çıkışında artış ADR nefropatisinde görülen bulgulardır. Deepa (114) 7,5 mg/kg adriyamisin enjeksiyonu ile ratlarda oluşturduğu nefropatide iki haftanın sonunda adriyamisin alanlarda kontrol grubuna göre anlamlı ağırlık kaybının olduğunu gözlemlemiştir. Javaid ve ark. (115) adriyamisin nefropatisi oluşturdukları ratlarda 24 saatlik idrar miktarlarında artış olduğunu saptamışlardır.

Çalışmamızda deney başlangıcında her dört gruptaki ratların ağırlıkları benzerdi. Adriyamisin enjeksiyonu yapılan üç gruptaki denekler 16. gün ağırlık kaybetmişti, deney sonuna kadar ağırlık kayıpları devam etti, kontrol grubundaki sağlıklı hayvanların ağırlıkları ise deney sonuna kadar artış gösterdi. Heparin ve prednizolon tedavisi altındaki iki grupta olan ratların 31. günde de tedavi verilmeyen grup ile benzer şekilde ağırlık kaybetmeye devam ettikleri görüldü. Adriyamisin kullandığımız süre ve dozlarda, ratlarda büyüme geriliğine neden olmuştur. Steroid ve heparin alan gruplarda bu ilaçların adriyamisinin yaptığı büyüme geriliğine etkisi görülmemiştir.

İdrar çıkışları başlangıç günü her dört grupta benzerdi, ancak ADR enjeksiyonundan sonra 16. günde ölçülen idrar miktarları her üç grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. İdrarın fazla çıkması 31. gün de ADR, PADR ve HADR gruplarında yüksekti. Tüm gruplarda ratların sıvı alımları birinci, 16. ve 31. günlerde istatistiksel olarak farklı değildi. ADR, PADR ve HADR gruplarında ağırlık kaybı, kontrol grubunda ise ağırlık artımı olduğundan kilo başına alınan sıvı miktarı ilk üç grupta daha fazla olmaktadır. Adriyaminin nefropatisi oluşturulan deneklerin ağırlık kaybından idrar çıkışındaki artış, eşlik eden metabolik bozukluklar olabileceği gibi beslenmelerinin bozulmasının da sorumlu olabileceği düşünüldü.

Zima ve ark.'nın (116) yaptığı deneysel çalışmada 5 mg/kg adriyaminin enjeksiyonu ile 3 haftada nefrotik sendrom oluşturulmuştur. Üç haftanın sonunda adriyaminin alan ratların serum kreatinin değerlerinde değişiklik gözlenmemiştir. El-Shitany ve ark. 'ı (111) ratlarda 10 mg/kg ADR ile yaptıkları nefropatide 30. gün kreatinin düzeyleri yaklaşık iki katından fazla artış göstermiştir. Ajith (117) 15 mg/kg adriyaminle oluşturduğu glomerülotoksisitede üç günde böbrek fonksiyonlarında bozulma olduğunu belirtmektedir.

Çalışmamızda kreatinin değerleri her dört grupta deney başında benzerdi. Adriyaminin etkisi altındaki üç grupta da serum kreatinin değerlerinde 31. gün düşüklük olduğu görüldü. Bizim 7,5 mg/kg ile 31. gün serum kreatinin düzeylerinde yükselme gözlemlememiş olmamız (Şekil 4) ciddi bir nefrotoksisite oluşmadığını düşündürdü. Kreatinin değerlerindeki düşmenin ratların vücut ağırlıklarının kaybına ve beslenmelerinin bozulmasına bağlı olabileceği düşünüldü.



Şekil 4. Grupların zaman içindeki kan kreatinin değerleri

Deepa (118) araştırmasında 7,5 mg/kg adriyamisin ile oluşturduğu nefropatide kan üre değerlerini adriyamisin alanlarda 15. gün yüksek saptamıştır. Düşük molekül ağırlıklı heparin tedavisi verilen grupta ise kan üre değerleri kontrol grubu ile benzer bulunmuştur.

Çalışmamızda deneklerin kan üre düzeyleri adriyamisine maruz kalındıktan 2 hafta sonunda belirgin farklılık göstermiyordu, ancak 31. günde ADR ve PADR gruplarında anlamlı olarak yüksekti. Araştırmamızda heparin tedavisi alan gruptaki hayvanların kan üre değerleri kontrol grubuna göre yüksek olmakla birlikte ADR grubunun değerleri kadar yüksek bulunmadı, ancak arada istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Deepa'nın çalışmasında (118) adriyamisin enjeksiyonundan bir hafta sonra başlanan ve bir hafta süre ile verilen düşük molekül ağırlıklı heparin alan ratlarda

kan albümin düzeyleri sağlıklı ratlar ile benzer, sadece adriyaminin verilen ratlardan belirgin yüksek bulunmuştur. Başka bir çalışmada da adriyamininle oluşturulan deneysel glomeruloskleroz modelinde düşük molekül ağırlıklı heparinlerin kan albümin düzeylerinde yükselmeye neden olduğu belirtilmektedir (119).

Yaptığımız deneyin başında tüm grupların kan protein değerleri benzerdi. Adriyaminin enjeksiyonu yapılan üç grubun proteinleri iki hafta sonra sağlıklı ratlara göre anlamlı düşüktü. İki haftalık steroid ve heparin tedavileri ile 31. günün sonunda kan protein değerlerinde yükselme görülmedi. Deneklerin kan albümin düzeylerinde de protein düzeyleri ile paralel sonuçlar gözlemlendi. Deney başındaki albüminler her dört grupta benzerdi, ancak 16. ve 31. gün değerleri ADR, PADR ve HADR gruplarında kontrol grubundan düşüktü. Adriyaminin etkisi ile kan protein düzeylerinde olduğu gibi albüminde de ikinci haftadan itibaren düşme vardı. Ancak 16. gün başlanan steroid ve heparin tedavisi ile albümin seviyelerinde yükselme olmadı, ADR grubundan farklı sonuçlar saptanmadı. Adriyaminin nefropatisinde gözlenmesi öngörülen kan protein ve albümin düzeyinde düşme çalışmamızda gerçekleşti. Ancak tedavi grupları ile fark oluşmadı. Bu sonuç tedavilerin nefrotik sendromu düzeltmede başarısız olduğunu göstermekle birlikte 15 günden sonra etki edip etmedikleri konusunda bilgi vermemektedir.

Lipoprotein lipaz aktivitesinde azalma, adriyaminin doğrudan lipid peroksidasyonu yapması ve hipoalbüminemi adriyaminin ile oluşan hiperlipidemiden sorumludur (120). Boonsanit ve ark. (121) araştırmasında adriyaminin verildikten 15 gün sonra plazma kolesterol ve lipid düzeylerinin yükseldiğini saptamışlardır. Deepa (114) 7,5 mg/kg adriyaminin verilen ratlarda bir hafta sonra başlanan ve bir hafta süre ile verilen düşük molekül ağırlıklı heparin (3

mg/kg/gün cetoparin sodyum) ile kan total kolesterol ve trigliserid düzeylerinde düşme olduğunu ve sağlıklı olan kontrol grubu ile benzer değerlere indiğini saptamıştır. Heparinlerin antihiperlipidemik etkisi lipoprotein lipazın aktivasyonu yolu ile sağlanmaktadır (81).

Çalışmamızdaki kan total kolesterol ve trigliserid düzeyleri adiyamisin etkisi altındayken 15 günün sonunda her üç grupta anlamlı olarak yükseldi. Bu yükseklik kontrol grubunda görülmedi. Tedavi uygulamalarının yapıldığı 30. günün sonunda ADR grubunda olduğu gibi PADR ve HADR gruplarında da kan total kolesterol ve trigliserid düzeylerindeki yükseklik devam etti. İki haftalık steroid ve heparin tedavileri kliniği düzeltmede etkili bulunmadı. Bu sonuçların araştırmamızda heparinin 1mg/kg/gün kadar düşük olmasından ve 15 günlük sürenin yetersiz kalmasından da kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

Kan sodyum düzeyi deney başında dört grupta da yakın değerlerdeydi. Adiyamisine maruz kalındıktan 15 gün sonra kan sodyum değerlerinde belirgin bir değişiklik olmadı. İki haftalık steroid ve hepain ile de herhangi bir değişiklik olmadı. Bu durum ratların elektrolit dengesizliği içinde olmadıklarını düşündürdü.

Kan potasyum değerleri birinci ve 16. günlerde yüksek saptandı. Bu durum kanın kuyruktan alındığı sırada hemoliz olması ile ilişkilendirildi. 31. gün sakrifikasyondan hemen önce anestezi altındayken intrkardiyak ponksiyon ile alınan kanda ise K^+ normal değerlerdeydi.

Kan kalsiyum değeri deneyin başında her dört grupta da benzerdi. Kan Ca'u adiyamisin verildikten 15 gün sonra ve steroid tedavisi ile heparin tedavisinden 15 gün sonraki değerleri kontrol grubundan düşük saptandı. Bu kalsiyum değerlerinin düşük olduğu dönemde kan albümin değerlerinin düşük olması ile eş zamanlıydı.

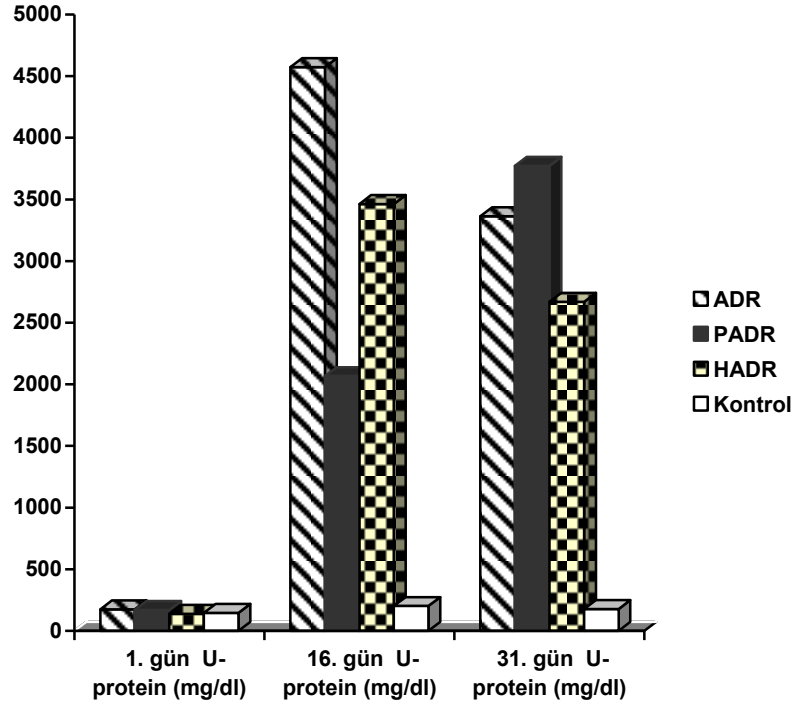
Kalsiyum düşüklüğü albümin düşüklüğüne bağlandı. Adriyamisin ile oluşturulan nefropatide ve heparin tedavisi altında kan sodyum, potasyum ve kalsiyum değerleri ile ilgili literatür bilgisi bulunamadı.

Kan glükozu deney başında gruplar arasında yakın değerlerde bulundu, ancak 16 ve 31. günler glüköz değerleri ADR, PADR ve HADR gruplarında kontrol grubundan anlamlı düşük saptandı. Steroid ve heparin tedavi gruplarında glüköz değerlerinde fark bulunmadı. Deneklerin protein kaybının ve beslenme bozukluğu olduğu bu dönemde, katabolik faza girmiş oldukları için, kan gliköz değerlerinin düşük olabileceği düşünüldü. Adriyamisin ile oluşturulan nefropatide ve heparin tedavisi verildiğinde kan gliköz seyri ile ilgili literatür bulunamadı.

Adriyamisinin enjeksiyonundan sonra yüksek dozlarda ilk hafta, daha düşük dozlarda ikinci hafta proteinüri görülmesi beklenen bulgudur. Podosit hasarı sonucunda ortaya çıkmaktadır (122). Oteki ve ark.'ı (123) 5mg/kg adriyamisin enjeksiyonu ile oluşturdukları nefropatide proteinürinin 14. gün ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Heparinin büyük molekül yapısı ve taşıdığı negatif yük sayesinde podosit hasarı ile bazal membranda oluşan negatif yük kaybını gidermektedir, dokuyu hasardan koruyup proteinüriyi iyileştirebildiği bildirilmektedir (124,125). Deepa (118) yaptığı araştırmada 7,5 mg/kg adriyamisin enjeksiyonundan bir hafta sonra bir hafta süre ile verilen DMAH'in (cetoparin sodyum 3mg/kg/gün) proteinüriyi kontrol grubu seviyesine yakın değerlere kadar düzelttiğini saptamıştır. Gottmann ve ark.'nın(125) araştırmasında ratlarda oluşturulan deneysel allograft nefropatisindeki proteinürinin deneyin 20. haftasından itibaren DMAH (reviparin 2 mg/kg/gün) ile yarı yarıya azaldığı, ancak sağlıklı kontrol grubundaki ratlardan daha yüksek değerlerde olduğu belirtilmiştir. Respiratuar sinsitiyal virus (RSV) taşıdığı

pozitif membran yükü nedeni ile enfeksiyonlarında glomerüler bazal membrandaki negatif yükü etkilemek yolu ile minimal lezyon hastalığında atağı tetiklemektedir. Yannan ve ark.'ı (126) ratlarda RSV enfeksiyonu modelinde proteinüri ile seyreden nefropati oluşturmuşlardır. DMAH ile 14 günlük tedavi sonunda bu ratlardaki proteinüri sağlıklı kontrol grubu değerleri ile benzer değerlere gerilemiştir. Gambaro ve ark.'ı (127) tip I ve tip II diyabetli, nefropatili veya mikroalbuminürili olgularda dört aylık oral heparin derivativesi sulodeksid ile tedavi sonunda proteinürinin düzeldiğini saptamışlardır. Krzossok ve grubu (128) nefrotik sınırdaki proteinüri ile seyreden ve hipertansiyon için ACE inhibitörü kullanan iki renal trasplant olgusunda DMAH ile proteinürinin düzeldiğini bildirmiştir.

Yaptığımız çalışmada idrar 24 saatlik protein değerleri deney başında gruplarda yaklaşık benzer değerlerdeydi. Adriyamisin verilmesi ile 16. gün ADR, PADR ve HADR gruplarında masif proteinüri saptandı. İki haftalık steroid ve hepain tedavileri verildikten sonraki 24 saatlik protein değerleri her iki grupta 16. gün değerleri kadar yüksekti, tedavi verilmeyen ADR grubundaki ratlar ile benzer değerlerdeydi. Literatürde belirtildiği gibi adriyamisin ile beklenen sürede proteinüri oluştu ancak DMAH tedavisi ile dediğimiz doz ve sürede proteinüride azalma hem steroid grubunda hem de heparin grubunda görülmedi (Şekil 5). Proteinürinin düzelmemesinin heparinin bu sürede etkili olmamasından da kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü.



Şekil 5. Grupların zaman içinde idrar protein değerleri.

Wang (97) araştırmasında 7,5 mg/kg adriyamisin ile yapılan nefropatide dört hafta sonra ratların kreatinin klirenslerinde anlamlı azalma, serum kreatinin değerlerinde artma saptamıştır. Deepa (118) iki haftalık sürede 5 mg/kg adriyamisinle idrar kreatinin değerlerinde azalma olduğunu belirtmektedir.

Çalışmamızda idrar kreatinin değerleri adriyamisin enjeksiyonundan 15 gün sonra kontrol grubundan daha düşük değerlere düşmektedir. Kreatinin değerlerindeki bu düşüklük deney sonuna kadar tüm gruplarda devam etmiştir, steroid ve heparin alan gruplarda düzelme görülmemiştir. Çalışmamızda idrar kreatinin değerlerinde azalma olmakla birlikte serum kreatinin değerlerinde artma yoktu, aksine düşüklük vardı. Yukarıda serum kreatinin değerlerindeki düşmenin

ağırlık kaybı ve beslenememe ile ilgili olabileceğini belirtmiştik. İdrar kreatinin değerlerindeki azalma literatürdeki sonuçlar ile benzerdi.

El-Shitany ve ark.'ı (111) 10mg/kg adriyaminin verdikleri ratlarda 30 günde böbreklerde histopatolojik olarak tübüler konjesyon, interstisyel hemoraji, vasküler dejenerasyon, glomerüler konjesyon, Bowman kapsülü ve proksimal tübüllerde dejenerasyon gördüklerini belirtmişlerdir. Wang'ın (97) çalışmasında 7,5mg/kg adriyaminle dört haftada %39 glomerüloskleroz, tübül çapında artış, tübül hücrelerinde yükseklik kaybı, tübüler atrofi, interstisyel hacim artışı oluşmuştur. Ji'nin (129) çalışmasında tek taraflı nefrektomi sonrası 6 mg/kg adriyaminle fokal segmental glomeruloskleroz, kapiller yatakta obstruksiyon, tübüler epitelde dejenerasyon, interstisyel fibrozisin dört haftada oluştuğu belirtilmiştir. Liu ve ark.'ı (130) 6,5 mg/kg adriyaminle 30 günde glomerüler atrofi oluşturmuşlardır. Ratlarda adriyaminin 5 mg/kg verilmesi ile 10 haftada glomeruler skleroz geliştiği, 28 haftada ise 10. haftadan üç kat fazla oluştuğu belirtilmektedir (98).

Çalışmamızda 7,5 mg/kg adriyaminin ile 30 günde glomeruloskleroz oluşmadığı görüldü. Ancak glomerüllerde nekroz, konjesyon ve Bowman kapsül aralığında genişleme ADR grubunda saptandı. Ayrıca ADR grubunda tübül epitelinde nekroz ve dejenerasyon, tübül çapında genişleme belirgindi. Ancak interstisyel fibrozis saptanmadı. Glomerulosklerozun oluşmaya başladığı ancak tamamlanmamış olabileceği düşünüldü.

Doku hasarında böbrekte ekstrasellüler matrikste kollagen III birikimi görülmektedir (131,132). Çalışmamızda da ADR grubundaki ratlarda mezangial matrikste kollagen III birikimi saptanması literatürdeki bilgiler ile uyumluydu. Adriyaminin, masif proteinüri ve hiperlipidemi glomerülotoksisite yapmaktadır.

Podositlerde, endotel ve tübül hücrelerinde oluşturdukları hasar sonucunda glomeruloskleroz ve interstisyel fibrozis gelişmektedir. Çalışmamızda verilen dozda ve sürelerde glomeruloskleroz oluşmaması, ancak akut histopatolojik değişikliklerin oluşması 30 günlük sürenin glomeruloskleroz oluşması için yeterli olmadığını düşündürdü. Çalışmamızın süresi hayvan kayıpları nedeni ile planlandığı gibi 12 hafta sürdürülemeyip 30 gün ile sınırlandırılmak zorunda kalındı. Daha düşük doz adriyamin ile uzun süreli benzer çalışmanın yapılmasının daha uygun olabileceği düşünüldü.

Baroni'in (124) çalışmasında adriyaminle glomeruloskleroz oluşturulan ratlarda 15. gün başlanıp 3 ay devam eden 500Ü/gün heparin tedavisi ile glomerüler hasarın önlendiği, ancak tübüler değişikliklerin etkilenmediği belirtilmiştir. Dos Santos ve ark.'nın (133) püromisin ile oluşturdukları nefropatide 10 hafta süre ile verdikleri DMAH ile histopatolojik olarak glomerüler değişikliklerin, glomerüler genişleme, glomerüler skleroz indeksi, mezangial genişlemenin düzeldiğini, ancak proteinürinin düzelmediğini belirtmişlerdir. Ichikawa ve ark.'ı (134) subtotal nefrektomi yaptıkları ratlarda kalan glomerülerdeki hiperperfüzyon, hipertansiyon ve hiperfiltrasyona dört haftalık heparin tedavisinin etkili olmadığını saptamışlardır. Zhang ve grubunun (135) çalışmasında adriyamin ile oluşturulan glomeruloskleroz modelinde heparin kalsiyum tedavisi ile 6 haftada proteinürinin iyileştiği, 12 haftada da glomerular skleroz indeksinin düzeldiğini belirtilmiştir.

Çalışmamızda iki haftalık DMAH tedavisi ile glomerüllerde nekroz, konjesyon ve Bowman kapsül aralığında genişlemenin oluşmadığı saptanmıştır, ayrıca tübül epitelinde nekroz ve dejenerasyon, tübül çapında genişlemenin de ADR

grubunda oluştuğu, ancak stroid ve heparin alan ratlarda oluşmadığı görülmüştür. Kollajen III birikiminin tedavi alan PADR ve HADR gruplarında ADR grubu kadar olmadığı saptanmıştır. Bu bulgular DMAH tedavisinin adriyaminin ile oluşturulan glomerüler ve tübüler hasarlanmada histopatolojik değişiklikler üzerine steroid kadar etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmanın sonuçları literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak DMAH'in adriyamininle oluşturulan nefrotik sendrom kliniğine 15 gün süre ile verilmesinin etkisi yoktur, ancak histopatoloji üzerine steroid kadar etkili bulunmuştur. Bu nedenle DMAH'in FSGS'da ek tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu konuda farklı doz ve sürelerde yapılacak çalışmalara gereksinim vardır.

SONUÇLAR

Adriyaminin 7,5 mg/kg dört hafta verilmesi ile;

1. Ratların büyümesi ve beslenmesi etkilenmemektedir.
2. Böbrek fonksiyonlarında bozulma olmamaktadır
3. Nefrotik sendrom kliniği proteinüri, hiperlipidemi, hipoalbuminemi 15. günde oluşmaktadır.
4. Kan sodyum değeri normal kalmaktadır, kan kalsiyumu ve glükozu azalmaktadır.
5. Glomerüllerde nekroz, konjesyon ve Bowman kapsül aralığında genişleme ve tübül epitelinde nekroz ve dejenerasyon, tübül çapında genişleme oluşmaktadır.
6. Glomerüllerde skleroz, interstisyel alanda fibrozis oluşmamaktadır.
7. Mezangial kollajen III birikimi oluşmaktadır.

DMAH'in adriyaminin nefropatisinde iki hafta verilmesi ile:

1. Ratların genel durumu, beslenmesi ve büyümesi düzelmemektedir.
2. Proteinüri azalmamaktadır.
3. Hipoalbuminemi ve hiperlipidemi etkilenmemektedir.
4. Kan kalsiyum ve glukoz düşüklüğünü düzelmemektedir.
5. Glomerüllerde nekroz, konjesyon, Bowman kapsül aralığında genişleme ve tübül epitelinde nekroz ve dejenerasyon, tübül çapında genişleme oluşması önlenmektedir.
6. Mezangial kollajen III birikimi önlenmektedir.

ÖZET

Fokal Segmental Glomerüloskleroz Modelinde Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinlerin Histopatolojik Skoru İyileştirme Etkisi

Son yıllarda fokal segmental glomeruloskleroz (FSGS) çocuklarda son dönem böbrek yetmezliği nedenleri arasında daha yüksek oranda yer almaktadır. Bu hastalığın yan etkileri yüksek olan steroid tedavisine ve diğer tedavilere yanıtı iyi değildir.

Bu araştırmada amacımız FSGS tedavisi için yeni, yan etkisi düşük, etkili tedavi seçeneği ortaya koyabilmek düşüncesi ile deneysel olarak ratlarda düşük molekül ağırlıklı heparinlerin FSGS'da histopatolojik ve klinik olarak yararlılığını araştırmaktır.

Deney altışarlı olmak üzere dört grup ile yürütüldü. Kontrol grubu sağlıklı ratlardan, ADR grubu 7,5 mg/kg adriyamisin verilen, PADR grubu adriyamisinden iki hafta sonra 15 gün steroid (5 mg/kg prednizolon) tedavisi verilen ve PADR grubu adriyamisin verildikten iki hafta sonra 15 gün süre ile düşük molekül ağırlıklı heparin (fraksiparin sodyum 2 mg/kg/gün) verilen gruplardan oluştu. Deneyin başında, 16. ve 31. günlerde kanda kreatinin, üre, protein, albümin, trigliserid, kolesterol, 24 saatlik idrarda protein ve kreatinin çalışıldı. Sakrifikasyon 31. günde yapıldı ve böbrek dokuları histopatolojik olarak değerlendirildi. Gruplar arası farklar tek yönlü varyans analizi, zamana göre karşılaştırmalar iki yönlü varyans analizi, histopatolojik veriler Pearson ki-kare exact testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Adriyaminin verdiğimiz doz ve sürede ratların büyümesi ve beslenmesi etkilendi, nefrotik sendrom kliniği proteinüri, hiperlipidemi, hipoalbuminemi 15. günde oluştu, fakat böbrek fonksiyonlarında bozulma olmadı. Histopatolojik olarak glomerüllerde nekroz, konjesyon ve Bowman kapsül aralığında genişleme ve tübül epitelinde nekroz ve dejenerasyon, tübül çapında genişleme ile mezangial kollajen III birikimi saptandı. Ancak glomerüllerde skleroz, interstisyel alanda fibrozis oluşmadı.

Düşük molekül ağırlıklı heparin ile verilen sürede ratların büyümesi gözlenmedi, idrar 24 saatlik proteini azalmadı, hipoalbuminemi ve hiperlipidemi düzelmedi. DMAH'in glomerüllerde nekroz, konjesyon ve Bowman kapsül aralığında genişlemeyi, tübül epitelinde nekroz ve dejenerasyonu, tübül çapında genişlemenin oluşmasını ve mezangial kollajen III birikimini önlediği saptandı.

Sonuç olarak düşük molekül ağırlıklı heparinlerin adriyaminle oluşturulan nefropatide 15 günlük sürede nefrotik sendrom kliniğine etki etmediği fakat histopatoloji üzerine yararı olduğu görülmüştür.

SUMMARY

The Curative Effect of Low Molecular Weight Heparins on Histopathological Score of Focal Segmental Glomerulosclerosis Model

Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is one of the major causes of end-stage renal failure in children. The response of patients with FSGS to corticosteroids and other immunosuppressive therapies is poor. There is a need of a new, efficient therapeutic agent with limited adverse effects in FSGS. The aim of this study was to investigate the histopathological and clinical efficacy of low-molecular weight heparin in rats with experimentally-induced FSGS.

The study consisted of 4 groups. Group ADR received adriamycin 7,5 mg/kg, group PADR received corticosteroids for 15 days two weeks after adriamycin administration, group HADR received low molecular weight heparin (fraxiparine sodium, 2 mg/kg/day, 15 days) two weeks after adriamycin administration and a control group involving healthy rats. Serum creatinine, urea, protein, albumin, trygliceride, cholesterol and daily urinary protein and creatinine were studied on days 0, 16 and 31. At day 31, all rats were sacrificed and histopathological study of renal tissues was performed. Differences of the groups were established by univariate analysis, comparisons according to time by multivariate analysis and histopathological data by Pearson chi-square exact test. Data were presented as mean \pm standard deviation; $p < 0.05$ was accepted as significant.

The growth and nutrition of rats were negatively affected and renal functions were preserved after administration of adriamycin. Signs of nephrotic syndrome as

proteinuria, hypoalbuminemia and hyperlipidemia were observed at day 15. Likewise, histopathological examination revealed glomerular necrosis and congestion, enlargement of Bowman capsule, tubular necrosis, degeneration and enhancement, and mesangial collagen deposition; glomerular sclerosis and interstitial fibrosis were not seen.

During the treatment period with low molecular weight heparin proteinuria, hypoalbuminemia and hyperlipidemia were not improved. However, in HADR and PADR groups glomerular necrosis and congestion, enlargement of Bowman capsule, tubular necrosis, degeneration and enhancement, and mesangial collagen deposition were similar to healthy control group.

We conclude that low molecular weight heparin is beneficial on the histopathology of adriamycin-induced nephropathy.

KAYNAKLAR

1. Türk Nefroloji Derneği Merkez Kayıt Kurulu. Registry of the Nephrology, Dialysis and Transplantation in Turkey. Registry 2004, 2005, 2007.
2. Valentini RP, Smoyer WE. Nephrotic Syndrome. In: Kher KK, Schnaper HW, Makker SP (eds). Clinical Pediatric Nephrology. London: Informa UK Ltd, 2007: 155 – 194.
3. Chesney RW. The idiopathic nephrotic syndrome. Current Opinion in Pediatrics 1999; 11: 158 – 161.
4. Özkaya N, Çakar N, Ekim M. Primary nephrotic syndrome during childhood in Turkey. Pediatrics International 2004; 46: 436–438.
5. Mallick NP. Epidemiology and natural course of idiopathic nephrotic syndrome. Clinical Nephrology 1991; 35: 3 – 7.
6. Ingulli E, Tejani A. Racial differences in the incidence and renal outcome of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis in children. Pediatr Nephrol 1991; 5: 393 – 397.
7. Srivastava T, Simon SD, Alon US. High incidence of focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic syndrome of childhood. Pediatr Nephrol 1999; 13: 13–18.
8. Benchimol C. Focal segmental glomerulosclerosis: Pathogenesis and treatment. Current Opinion in Pediatrics 2003; 11: 173 – 180.
9. Boyer O, Moulder JK, Somers MJG. Focal and segmental glomerulosclerosis in children: a longitudinal assessment. Pediatr Nephrol 2007; 22: 1159 – 1166.
10. Kitiyakara C, Eggers P, Kopp JB. Twenty-one-year trend in ESRD due to focal segmental glomerulosclerosis in the United States. Am J Kidney Dis 2004; 44: 815 – 25.
11. D'Agati VD. The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: new insights. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2008; 17: 271 – 281.

12. Rosenblum ND. Structure and development of the kidney. In: Kher KK, Schnaper HW, Makker SP (eds). *Clinical Pediatric Nephrology*. London: Informa UK Ltd, 2007: 3-14.
13. Elger M, Kriz W. The renal glomerulus, the structural basis of ultrafiltration. In: Davidson AM; Grünfeld JP, Kerr D, Ritz E (eds). *Oxford textbook of clinical nephrology*, Oxford: Oxford University Press, 1992: 129 – 140.
14. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE. Sustained expression of TGF- β 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney International* 1994; 45: 916 – 927.
15. Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol* 2003; 7: 255 – 259.
16. Rennke HG, Denker BM. (Çev: Tevfik Ecdar). *Böbrek Fیزیopatolojisi. Temel Bilgiler*. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık Ltd Şti, 2008.
17. Jones CL, Buch S, Post M. Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Am J Pathol* 1992; 141: 1381 – 1396.
18. Ichikawa and Fogo E. Focal Segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 1996; 10: 374 – 391.
19. Schwartz MM, Korbet SM. Primary focal segmental glomerulosclerosis: pathology, histological variants, and pathogenesis. *Am J Kidney Dis* 1993; 22: 874 – 883.
20. Meyrier A. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis (Review). *Nature Clinical Practice Nephrology* 2005; 1: 44 – 54.
21. Detwiler RK, Falk RF, Hogan SL. Collapsing glomerulopathy: a clinically and pathologically distinct variant of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1994; 45: 1416 – 1424.
22. Reidy K, Kaskel FJ. Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 350 – 354.
23. Kwok C, Shannon MB, Miner JH, Shaw A. Pathogenesis of nonimmune glomerulopathies. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006; 1: 349 – 374.

24. De Heer E, Sijpkens YWJ, Verkade M. Morphometry of interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 72 – 73.
25. Nadasdy T, Silva FG, Hogg RJ. Minimal change nephrotic syndrome focal sclerosis complex. In: Tisher CC, Brenner BM (eds). *Renal pathology: With clinical and functional correlations*. Philadelphia: JB Lippincot Company, 1994: 331 – 389.
26. Baker AJ, Money A, Lombardi D et al. Mesangial cell apoptosis: The major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 1994; 94: 2105–2116.
27. Velosa JA, Holley KE, Torres VE, Offord KP. Significance of proteinuria on the outcome of renal function in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Mayo Clin Proc* 1983; 58: 568 – 577.
28. Couser WG, New Insights Into Mechanisms of Immune Glomerular Injury. *West J Med* 1994; 160: 440-446.
29. Lonnemann G, Shapiro L, Engler-Blum G. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. Interleukin-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. *Kidney Int* 1995; 47: 837 – 844.
30. Yoshioka K, Takemura T, Mrakami K. In situ expression of cytokines in IgA nephritis. *Kidney International* 1993; 44: 825 – 833.
31. Noronha IL, Niemir Z, Stein H, Waldherr R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 775 – 786.
32. Heeger PS, Smoyer WE, Saad T. Anti-tubular basement membran disease (alpha TBM disease) produces T cell-mediated interstitial nephritis in SJL mice after immunization with renal tubular antigen. *J Clin Invest* 1994; 94: 2084 – 2092.
33. Lagrue G, Xheneumont S, Branellec A, Weill B. Lymphokines and nephrotic syndrome. *Lancet* 1985; 1: 271- 272.
34. Heldin CH, Wasteson A, Westermark B. Platelet derived growth factor. *Mol Cell Endocrinol* 1985;39:169-187.

35. Fellström B, Klareskog L, Heldin CH. Platelet-derived growth factor receptors in the kidney-Upregulated expression in inflammation. *Kidney International* 1989;36:1099-1102.
36. Zhang G, El Nahas AM. Platelet-derived growth factor in experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10: 787-795.
37. Imai E, Arai M, Isaka I. Phenotypic change of the mesangial cells is induced by overexpression of the TGF- β in vivo glomerulus (abstract). *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 782.
38. Tamaki K, Okuda S, Ando T. TGF- β 1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis of adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 1994; 45: 525–536.
39. El Nahas AM, Muchaneta-Kubara EC, Zhang GZ. Phenotypic modulation of renal cells during experimental and clinical renal scarring. *Kidney Int* 1996; 49 (Suppl 54): 23 – 27.
40. Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibition in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1986; 77: 1993 – 2000.
41. Remuzzi A, Puntorieri S, Battaglia C et al. Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat. *J Clin Invest* 1990; 85: 541 – 549.
42. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A et al. Renal injury from angiotensin II – mediated hypertension. *Hypertension* 1992; 19: 464 – 474.
43. Wolf G, Killen PD, Neilson EG. Intracellular signaling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II – induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells. *Cell Regul* 1991; 260:219 – 227.
44. Wight JP, Bassett AH, Le Carpentier JE et al. Effect of treatment with enalapril, verapamil and indomethacin on compensatory renal growth in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5: 777 – 780.

45. Querfeld U. Should hyperlipidemia in children with the nephrotic syndrome be treated? *Pediatr Nephrol* 1999; 13: 77 – 84.
46. Nikolic-Paterson DJ, Main IW, Tesch GH. Interleukin-1 in renal fibrosis. *Kidney International* 1996; 49: 88 – 90.
47. Lonnemann G, Engler-Blum G, Muller GA et al. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. Intrinsic IL-1 synthesis and IL-1 dependent production of IL-6 and IL-8 by cultured kidney fibroblasts. *Kidney Int* 1995; 47: 854 – 854.
48. ZucchelliP, Zuccala A. Progression of renal failure and hpertensive nephrosclerosis. *Kidney Int* 1998; 68: 55 – 59.
49. El Nahas AM. Renal scarring: the role of angiotensin II. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 28-32.
50. Harris DCH, Chan L, Schrier RW. Remnant kidney hypermetabolism and progression of chronic renal failure. *Am J Physiol* 1988; 254: 267 - 276.
51. Eddy AA. Experimental insights into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesions (editorial). *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 1273 – 1287.
52. Neilson EG. Pathogenesis and therapy of interstitial nephritis. *Kidney Int* 1989; 35: 1257 – 1270.
53. Floege J, Johnson RJ, Gordon K. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis. *Kidney Int* 1991; 40: 477 – 488.
54. Goumenos DS, Brown CB, Shortland J, El Nahas AM. Miyofibroblasts, predictors of progression of mesangial IgA nephropathy? *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:1418 – 1425.
55. Schnaper HW. Balance between matrix synthesis and degradation: a determinant of glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 1995; 9: 104 – 111.
56. Berdeli A, Mir S, Yavaşcan Ö, Serdaroğlu E, Bak M, Aksu N, Öner A, Anarat A, Dönmez O, Yıldız N, Sever L, Tabel Y, Düşünsel R, Sönmez F, Çakar N. NPHS2 (podocin) mutations in Turkish children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 2031-2040.

57. Niaudet P. Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P (eds). *Pediatric Nephrology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004: 557 – 73.
58. Haws RM, Baum M. Efficacy of albumin and diuretic therapy in children with nephrotic syndrome. *Pediatrics* 1993; 91: 1142.
59. White RHR, Glasgow EF, Mills RJ. Clinicopathological studies of nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* 1970; i: 1353 – 1359.
60. Gür Güven A, Beşbaş N, Çalışkan S. Çocuklarda Nefrotik Sendrom. *Çocuk Nefroloji Derneği Yayınları*, 4: 2006.
61. Tune BM, Mendoza SA. Treatment of the idiopathic nephrotic syndrome: regimens and outcomes in children and adults. *J Am Soc Nephrol* 1997; 826 – 832.
62. Tune BM, Lieberman E, Mendoza SA. Steroid-resistant nephrotic focal segmental glomerulosclerosis. A treatable disease. *Pediatr Nephrol* 1996; 10: 772 – 778.
63. Tune BM, Kirpekar R, Sibley RK. Intravenous methylprednisolone and oral alkylating agent therapy of prednisone-resistant pediatric focal segmental glomerulosclerosis. A long term follow-up. *Clin Nephrol* 1995; 43: 84- 88.
64. Siegel NJ, Gaudio KM, Krassner LS. Steroid dependent nephrotic syndrome in children: histopathology and relapses after cyclophosphamide treatment. *Kidney Int* 1981; 19: 454 – 459.
65. Mahmoud I, Basuni F, Sabry A. Single-centre experience with cyclosporin in 106 children with idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 735 – 742.
66. Hodson EM, Habashy D, Craig JC. Interventions for idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome in children. Issue 1: <http://www.thecochranelibrary.com/2009>.
67. Hodson EM, Willis NS, Craig JC. Non-corticosteroid treatment for nephrotic syndrome in children (Review). The Cochrane Collaboration and published in The Cochrane Library 2009, Issue 1. <http://www.thecochranelibrary.com>.

68. Tenbrock K, Muller-Berghaus J, Fuchhuber. Levamisole treatment in steroid-sensitive and steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 459.
69. Dellucchi A, Cano F, Rodriguez E. Enalapril and prednisone in children with nephrotic range proteinuria. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 1088.
70. Fogo AB. Can glomerulosclerosis be reversed? *Nature Clinical Practice Nephrology* 2006; 2: 290 – 291.
71. Afzal K, Bagga Arvind, Menon S. Treatment with mycophenolate mofetil and prednisolone for steroid-dependent nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 2059-2065.
72. Cattran DC, Wang MM, Apel G. Mycophenolate mofetil in the treatment of focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Nephrol* 2004; 62: 405-411.
73. Del Rio M, Kaskel F. Evaluation and management of steroid-unresponsive nephrotic syndrome. *Current Opinion in Pediatrics* 2008; 20: 151 – 156.
74. Gipson DS, Gibson K, Gipson P. Therapeutic approach to FSGS in children. *Pediatric Nephrol* 2007; 22: 28 – 36.
75. Baysal YE. Nefrotik sendromlu ratlarda Siklosporin A, mikofenolat mofetil, Vitamin A, D, E ve N-asetilsistein'in etkileri. Akdeniz Üniversitesi Çocuk Nefrolojisi BD, Yandal uzmanlık tezi, Antalya 2007.
76. Abrantes MM, Cardoso LSB, Lima EM. Clinical course of 110 children and adolescents with primary focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 2006; 21: 482 – 489.
77. Beauvils H, Alphonse JC, Guedon J, Legrain M. Focal glomerulosclerosis: natural history and treatment. A report of 70 cases. *Nephron* 1978; 21: 75 - 85.
78. Meyrier A. Nephrotic focal segmental glomerulosclerosis in 2004: an update. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 2437 – 2444.
79. Weber S, Tönshoff B. Recurrence of Focal-Segmental Glomerulosclerosis in Children after Renal Transplantation: Clinical and Genetic Aspects. *Transplantation* 2005; 80: 128 – 134.

80. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 2. Cilt. Ankara: Feryal Ltd Şti, 1992: 1394 – 1444.
81. Hirsh J, Raschke R, Warkentin TE. Heparin: Mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 1995; 108: 258 – 275.
82. De Kort M, Buijsman RC, Van Boeckel CAA. Synthetic heparin derivatives as new anticoagulant drugs. *Drug Discovery Today* 2005; 10: 769 – 779.
83. Hetzel GR, Sucker C. The heparins: all a nephrologist should know. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 2036 – 2042.
84. Raats CJI, Van den Born J, Berden JHM. Glomerular heparan sulfate alterations: Mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney International* 2000; 57: 385–400.
85. Ceccarelli M, Bani D, Cinci L. Anti-inflammatory effects of low molecular weight heparin derivative in a rat model of carrageenan-induced pleurisy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009; (in print).
86. Hochart H, Jenkins PV, Preston RJS. Concentration-dependent roles for heparin in modifying lipopolysaccharide-induced activation of mononuclear cells in whole blood. *Thrombosis and Haemostasis* 2008; 99: 570-575.
87. Wan JG, Mu JS, Zhu HS, Geng JG. N-desulfated non-anticoagulant heparin inhibits leukocyte adhesion and transmigration in vitro and attenuates acute peritonitis and ischemia and reperfusion injury in vivo. *Inflamm Res* 2002; 51: 435 – 443.
88. Gao Y, Fei R, Chen Z. P-Selectin-mediated acute inflammation can be blocked by chemically modified heparin, RO-heparin. *Mol Cells* 2005; 19: 350 – 355.
89. Gabr AA, Reed M, Newman DR. Alterations in cytoskeletal and immune function-related proteome profiles in whole rat lung following intratracheal instillation of heparin. *Respir Res* 2007; 36; 1-15.

90. Deepa PR, Varalakshmi P. Beneficial cardio-renal effects of a low-molecular-weight heparin-derivative on adriamycin-induced glycosaminoglycanuria and tissue lipid abnormalities. *Toxicology* 2005; 211: 77 – 85.
91. Itoh K, Nakao A, Kishimoto W, Takagi H. Heparin effects on superoxide production by neutrophils. *Eur Surg Res* 1995; 27: 184- 188.
92. Civelek A, Ak K, Kurtkaya Ö, Tekeli A, İşbir S, Nargileci E, Arsan S, Sav A.. Effect of a Low Molecular Weight Heparin Molecule, Deltaparin on Cellular apoptosis and Inflammatory Process in an Incisional Wound – Healing Model. *Surg Today* 2007; 37: 406-411.
93. Carrero JJ, Yilmaz Mİ, Lindholm B, Stenvinkel P. Cytokine Dysregulation in Chronic Kidney Disease: How Can We Treat It? *Blood Purif* 2008; 26: 291 – 299.
94. Wijnhoven TJ, Lensen JF, Rops AL, McCarthy KJ. Anti-proteinuric effects of glycosaminoglycan-based drugs. *Curr Opin Mol Ther* 2007; 4: 364 – 377.
95. Yang X, Chen X, Xu Q. Effects of low-molecular-weight heparin on proliferative glomerulonephritis. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1997; 36: 731- 735.
96. Song H, Li X, Zhu C, Wei M. Glomerulosclerosis in adriamycin-induced nephrosis is accelerated by a lipid-rich diet. *Pediatr Nephrol* 2000; 15: 196 – 200.
97. Wang Y, Mahajan D, Tay YC. Partial depletion of macrophages by ED7 reduces renal injury in adriamycin nephropathy. *Nephrology* 2005; 10: 470- 477.
98. Manabe N, Kinoshita A, Yamaguchi M. Changes in Quantitative Profile of Extracellular Matrix Components in the Kidneys of Rats with Adriamycin-induced Nephropathy. *J Vet Med Sci* 2001; 63:125-133.
99. Grond J, Weening JJ, Elema JD. Glomerular sclerosis in nephrotic rats. Comparison of the long-term effects of adriamycin and aminonucleoside. *Lab Invest* 1984; 51: 277 – 285.

100. Rangan GK, Coombes JD. Renoprotective effects of sirolimus in non-immune initiated focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2175 – 2182.
101. Lu Y, Deng A, Li N, et al. Changes in angiotensin expression in glomeruli involved in glomerulosclerosis in rats with daunorubicin-induced nephrosis. *Acta Pharmacologica Sinica* 2006; 27: 579 – 587.
102. Deepa PR, Varalakshmi P. Influence of a low-molecular-weight heparin derivative on the nitric oxide levels and apoptotic DNA damage in adriamycin-induced cardiac and renal toxicity. *Toxicology* 2006; 217: 16 – 183.
103. Deman A, Ceyssens B, Pauwels M. Altered antioxidant defence in a mouse adriamycin model of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 147- 150.
104. El-Shitany NA, El-Haggag S, El-Desoky K. Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 2422 – 2428.
105. Park JC, Hong YS, Kim YL. A metabonomic study on the biochemical effects of doxorubicin in rats using H-NMR spectroscopy. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 2009; 72: 374-384.
106. Bertani T, Rocchi G, Sacchi G, Mecca G, Remuzzi G. Adriamycin induced glomerulosclerosis in rat. *Am J Kidney Dis* 1986; 7: 12 – 19.
107. Wang Y, Mahajan D, Tay YC. Partial depletion of macrophages by ED7 reduces renal injury in adriamycin nephropathy. *Nephrology* 2005; 10: 470 – 477.
108. Burtis CA, Ashwood ER (eds). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994.
109. Danaway AB, Hirst AD, Perry DE. A critical assessment of current analytical methods for the routine assay of serum total protein and recommendations for their improvement. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 556-67.
110. Roeschlau P, Bernt E, Gruber WA. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Z Klin ChemKlin Biochem* 1974; 12: 226

111. McGowan MW, Artiss JD, Strandberg DR; et al. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem.* 1982; 29:538-42
112. Burtis CA, Ashwood ER (eds). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001.
113. Gulmen S, Kiris I, Narin C. Tezosentan reduces the renal injury induced by abdominal aortic ischemia-reperfusion in rats. *Journal of Surgical Research* 2008 (in print).
114. Deepa PR, Varalakshmi P. Beneficial cardio-renal effects of a low molecular weight heparin derivative on adriamycin induced glycosaminoglycanuria and tissue lipid abnormalities. *Toxicology* 2005; 211: 77-85.
115. Javaid B, Olson JL, Meyer TW. Glomerular injury and tubular loss in adriamycin nephrosis. *J Am Nephrol* 2001; 12: 1391- 1400.
116. Zima T, Tesar V, Crkovska J, et al. ICRF-187 (dexrazoxan) protects from adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1975 – 1979.
117. Ajith TA, Aswathy MS, Hema U. Protective effect of *Zingiber officinale* roscoe against anticancer drug doxorubicin-induced acute nephrotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 3178 - 3181.
118. Deepa PR, Varalakshmi P. The cytoprotective role of a low-molecular-weight heparin fragment studied in an experimental model of glomerulotoxicity. *European Journal of pharmacology* 2003; 478: 199-205.
119. Zhang H, Ji LZ, Wu K. Experimental study of low-molecular weight heparin on ameliorating progressive glomerulosclerosis. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2001; 26: 7-9.
120. Hall RL, Wilke WL, Fettman MJ. The progression of adriamycin induced nephrotic syndrome in rats and effect of captopril. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 82: 164 – 174.

121. Boonsanit D, Kanchanapangka S, Branakarl C. L-carnitine ameliorates doxorubicin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrology* 2006; 11: 313 – 320.
122. Gopala KR, Coombes JD. Renoprotective effects of sirolimus in non—immune initiated focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2175-2182.
123. Oteki T, Nagase S, Yokoyama H. Normalizing renal reducing ability prevents adriamycin-induced proteinuria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 337: 48 – 51.
124. Baroni EA, Costa RS, da Silva CG, Coimbra TM. Heparin treatment reduces glomerular injuri in rats with adriamycin-induced nephropathy but does not modify tubulointerstitial damage or the renal production of transforming growth factor-beta. *Nephron* 2000; 84: 248-257.
125. Gottmann U, Mueller-Falcke A, Schuelle P. Influence of hypersulfated and low molecular weight heparins on ischemia/reperfusion: incury and allograft rejection in rat kidneys. *The Authors Journal compilation European Society for Organ Transplantation* 2007; 20: 542-549.
126. Yannan G, Zheng W, Liqun. Ability of low-molecular –weight heparin to aleleviate proteinuria by inhibiting respiratory syncytial virus infection. *Nephrology* 2008; 13: 545 – 553.
127. Gambaro G, Kinalska I, Oksa A. Oral sulodexide reduces albuminuria in microalbuminuric and macroalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients: the Di.N.A.S. randomized trial. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1615 – 1625.
128. Krzossok S, Birck R, Koeppel H. Treatment of proteinuria with low-molecular-weight heparin after renal transplantation. *Transplant Int* 2004; 17: 468 – 477.
129. Ji Z, Huang C, Liang C. Protective effects of blocking renin-anjiotensin system on the progression of renal injuri in glomerulosclerosis. *Cellular & Molecular Immunology* 2005; 2: 150 – 154.

130. Liu LL, Li QX, Xia L. Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 2007; 231: 81-90.
131. Söylemezoğlu O, Wild G, Dalley S, McNeil S, Mildford-Ward A, Brown CB, el Nahas AM. Urinary and serum type III collagen: makers of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1883 – 1889.
132. Sönmez F. İgM Nefropatili ve Fokal Glomerulosklerozlu Çocuklarda Böbrek Dokusunun Kollagen III ve IV İçerikleri ve Klinikopatolojik Bulgularla Karşılaştırılması, Yandal Uzmanlık Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1997.
133. Dos Santos AM, de Oliveira AV, da Silva Lemos CC. Low molecular weight heparin in the treatment of puromycin-induced nephrosis. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 157 – 163.
134. Ichikawa I, Yoshida Y, Fogo A. Effect of heparin on the glomerular structure and function of remnant nephrons. *Kidney Int* 1988; 34:638 – 644.
135. Zhang BL, Li ZJ, Song LY. Experimental study on prevention and treatment of focal segmental glomerulosclerosis with heparin. *Zhongguo Wei Zhong Bind Ji Jiu Yi Xue* 2004;16:26-28.