

Kronik Puromisin Aminonükleozid (PAN) Nefrozda Renal Fonksiyon, Böbrek Cisimciği Ultrastrüktürü ve Slit Por Sayısı Arasındaki İlişkiler

Relationship of Renal Function, Glomerular Ultrastructure and Slit Pore Count in Chronic Puromycin Aminonucleoside Nephrosis

İsmail Seçkin¹, Mümin Uzunalan¹, Sibel Köktürk¹, Bülent Uruluer¹, Güngör Şatıroğlu¹, Meltem Pekpak², Hüseyin Sönmez³, Zeynep Öztürk³

¹İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Nefroloji BD, İstanbul

³İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, İstanbul

ÖZET

Puromisin aminonükleozid (PAN) masif proteinüri ile seyreden podosit yaranmasının bir modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. PAN nefrozlu sıçan glomerüllerinde, minimal değişikliklere sahip insan nefrotik sendromundakilere benzeyen histolojik değişiklikler gösterilmiş, fakat PAN'ın etkisinin tam mekanizması tamamı ile anlaşılamamıştır. Biz de sıçanlarda deneysel olarak oluşturduğumuz kronik PAN nefrozda renal fonksiyon, böbrek cisimciği ultrastrüktürü ve slit por sayısı arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladık.

1.67 mg/100 g PAN subkutanöz olarak 12 hafta süre ile uygulandı.

Deney gruplarında proteinüri değeri kontrolde 4.83 ± 3 mg/24 saat iken, kronik nefroz grupta 50 kat artarak 247.5 ± 90 mg/24 saate yükseldi. Bu gruplarda zikredildikleri sıra ile serum albümin ortalaması 3.23 ± 0.1 g/dL'den 2.35 ± 0.38 g/dL'ye, kreatinin klirensi ortalaması ise 0.55 ± 0.8 mL/dak'dan 0.29 ± 0.1 mL/dak'ya azalmıştı. Hayvanların ortalama ağırlıkları ise kronik grupta fazlaca artarak 100 ± 8.94 'ten 210 ± 24.49 g'a (kronik grup) yükselmişti.

Kronik grupta podosit ayakçıları kaynaşma/çekilmeleri neticesi glomerüler bazal membran (GBM) üzerinde fazlaca uzamış podosit çıkıntıları, özellikle perimezangiyal GBM bölgelerinde podosit ayakçılarının tamamıyla kaybolduğu soyulmuş GBM bölgeleri gözlemlendi. Işık mikroskopuyla yapılan semikantitatif çalışmada da, kronik grupta fazlaca mezangiyal matriks artışı gözlemlendi.

Artmış mezangiyal matriks içinde apoptotik özellikler gösteren mezangiyal hücrelere, interstisyel kolajene ve makrofajlara sıklıkla rastlandı. Endotel hücrelerinde de sıklıkla apoptotik görüntüler gözlemlendi. Morfometrik çalışmada da $10 \mu\text{m}$ uzunluğundaki GBM sahasında slit por sayısı ortalaması 32.68 ± 0.62 'den (kontrol), 4.87 ± 1.45 (kronik grup) azalmıştı.

Kronik grubun daha düşük proteinüri gösteren sıçanlarında hipertrofik, ultrastrüktürden zengin ve yer yer çift nüve ihtiva eden podositler gözlemlendi. Bu hayvanlarda GBM'de fokal kalınlaşmalar, invaginasyonlar (podosit ayakçığına doğru) synechia'lara rastlandı.

Yüksek proteinüri gösteren sıçanlarda podositlerde psödokistik dejenerasyon, fazlaca inceltme, uzamalar ve GBM'de de fazlaca inceltmeler gözlemlendi.

Bulgularımız kronik PAN uygulamasının bozulan renal fonksiyon ile ilişkili giderek artan podosit dejenerasyonu, slit por azalması, podosit ayakçılarının yok olması (GBM çıplaklaşması), GBM inceltmesi, mezangiyumda matriks artışı, interstisyel kolajenin belirmesi, makrofajların görülmesi ve mezangiyal, endotel hücre apoptozisi ile birlikte seyreden bir nekrotik sendromu indüklediğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: ultrastrüktür, proteinüri, morfometri, apoptoz, glomerül.

Yazışma adresi: Prof. Dr. İsmail Seçkin

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri,

Histoloji ve Embriyoloji AD, Cerrahpaşa, İstanbul

Tel: 0 (212) 414 30 27

E-posta: isseckin@istanbul.edu.tr

ABSTRACT

Background and Design: In order to create massive proteinuria, puromycin-aminonucleoside (PAN) is one of the most used models. Podocyte injury causes proteinuria. PAN rats' glomeruli show alterations like minimal change disease in humans, but the mechanism of PAN is not yet understood in total. We aimed to evaluate and show the relationship of renal function and the changes of the ultrastructure of the glomeruli, including the number of slit pores in puromycin-aminonucleoside induced chronic nephrosis.

Results: 1.67 mg/100 g bodyweight puromycin-aminonucleoside was given subcutaneously to Wistar rats for 12 weeks (the first three weeks, one injection per week; and then, one injection every other week).

In the control animals proteinuria was 4.83 ± 3 mg/24 hours and increased up to 247.51 ± 90 mg/24 hours, a fifty fold. Serum albumin in control animals was 3.23 ± 0.1 g/dL and decreased to 2.35 ± 0.38 g/dL, creatinine clearance decreased from 0.55 ± 0.8 mL/min to 0.29 ± 0.1 mL/min. The mean bodyweight increased from 100 ± 8.94 g to 210 ± 24.49 g in the chronic nephrosis animals.

Foot processes were fused or retracted. The glomerular basement membrane (GBM) showed elongated podocyte spikes, especially the perimesangial parts of the GBM foot processes were totally lost and denuded basement membrane could be observed. With help of light microscopy, we observed semiquantitatively significant mesangial matrix expansion in the chronic group animals. Within the expanded mesangial matrix we could see apoptotic mesangial cells, interstitial collagen and frequently macrophages. Endothelial cells also showed apoptotic characteristics. Evaluating morphometrically $10 \mu\text{m}$ of the GBM, slit pore count decreased from 32.68 ± 0.62 in controls to 4.87 ± 1.45 in the chronic rats.

In the rats with lesser proteinuria, hypertrophic, ultrastructurally rich and sometimes two nucleolus containing podocytes were observed. GBM was focally thickened, invagination into the foot processes and synechias were found. In rats with higher proteinuria, podocytes had pseudocystic degeneration, more thinning elongations and thinning of the basement membranes.

Conclusion: We conclude that in rats with chronic puromycin-aminonucleoside nephrosis podocytes degenerate. Slit pore counts decrease and foot processes were lost. Denudation and thinning of the GBM was observed and expansion of the mesangial matrix could be seen. Within the matrix interstitial collagen, macrophages, mesangial and endothelial cell apoptosis established with progressing renal failure and induced the nephrotic syndrome.

Keywords: ultrastructure, proteinuria, morphometry, apoptosis, glomerulus

2007;16 (3) 109-121

Giriş

Normal glomerüller strüktür ve fonksiyonun sürdürülmesi glomerüller hücreler olan podositler, mezangiyal hücreler ve endotel hücrelerinin arasındaki ilişkiye bağlı olup, bunların herhangi birinin yetersizliği glomerüloskleroze yol açmaktadır (1,2). Yakın yıllarda podosit yaralanmasının ve kaybının glomerüloskleroze yol açan merkezi bir faktör olabileceği desteklenmiştir (1,3-5). *In vivo* (6) ve *in vitro* (7) çalışmalarda podositlerin glomerüller kapillerlerin selektif permeabilitesini sağlamak ile alakalı olduğu ve podosit ayaklarının kaynaşması/çekilmesi neticesi slit por sayısındaki azalmanın ve onun haraplanması neticesi oluşmuş soyulmuş glomerüller bazal membran (GBM) bölgelerinin artan proteinüriden sorumlu olduğu desteklenmiştir (8-10).

Puromisin aminonükleozid (PAN) masif proteinüri ile seyreden podosit yaralanmasının bir modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (1,3,4,11,12). PAN nefrozlu sıçan glomerüllerinde, minimal değişikliklere sahip insan nefrotik sendromundakilere benzeyen histolojik değişiklikler gösterilmiş (11), fakat PAN'ın etkisinin tam mekanizması tamamı ile anlaşılamamıştır.

Biz önceki çalışmamızda akut PAN nefrozdaki ultrastrüktürel bulgularımızı yayımlamıştık (13). Bu çalışmamızda, Marinides ve arkadaşlarının (14) modeline

uygun olarak oluşturduğumuz kronik PAN nefrozda renal fonksiyon ve korpuskulum renale malpighi ultrastrüktürü ile slit porlardaki sayısal değişiklikler arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladık.

Yöntem ve Gereçler

Wistar sıçanlar iki gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol olarak kullanıldı. Grup 2 kronik PAN grubunu oluşturdu. Bu gruptaki sıçanlara Marinides ve arkadaşları (14) kronik PAN modeline uygun olarak serum fizyolojikte çözüldürülmüş 1.67 mg/100 g puromisin aminonükleozid (PA) subkütanöz olarak ilk üç hafta haftada 1 enjeksiyon, sonraki haftalarda iki haftada bir enjeksiyon olmak üzere 12 hafta uygulandı. Deney gruplarındaki hayvanların PA enjeksiyonu başlamadan önce deney süresince ve deney sonunda hayvanlar öldürülmeden önce 24 saatlik idrarları toplandı ve biraz değiştirilmiş triklorasetik asit (TCA) (15) yöntemi ile proteinüri ölçümü yapıldı (Tablo D). Yine öldürülmeden önce hayvanlar tartıldı ve eter anestezisi altında kan örnekleri alındı. Kan örneklerinde albümin (BCG yöntemi ile), kreatinin klirensi (Saffe yöntemi ile) belirlendi. Her iki grupta da kan ve idrar bulguları Tablo F'de gösterilmiştir. Daha sonra sıçanların sol böbrek korteksleri ışık ve elektron mikroskopi (E.M.) incelemeleri için hazırlandı. Işık mikroskopi incelemeleri için alınan parçalar fosfat tamponu (Ph 7, 2) ile hazırlanmış %10 formol ile fikse

Tablo I. Kronik nefroz grubu proteinüri değerleri

Proteinüri mm/24 saat	1. Enj öncesi	3. Enj 3. hafta	5. Enj 7. hafta	6. Enj 9. hafta	7. Enj 12. hafta
1. Denek	4.19	21.68	10.37	83.56	140.61
2. Denek	2.69	22.5	20.92	84.60	245.92
3. Denek	6.44	46.12	44.84	105.76	161.11
4. Denek	7.78	30.49	50.29	316.08	314.31
5. Denek	6.26	45.06	59.60	252.45	246.05
6. Denek	4.75	40.99	59.78	262.96	377.00
Ortalama	5.18	34.39	40.96	184.23	247.50

Tablo II. Deney gruplarının proteinüri, serum albümin, kreatinin klirensi, ağırlık ve idrar değerleri

	Proteinüri (24 saat, mg)	Serum Albümin (g/dL)	Kreatinin Kl. (mL/dak)	Ağırlık (g)	İdrar Volümü (cc/24 saat)
Kontrol	Baş.: 3.12±2.4 Son: 4.87±3	3.23±0.1	0.55±0.8	Baş.: 105±13.78 Son: 140±15.49	7.2±2.1 11.5±2.3
Kronik	Baş.: 5.18± 2.2 Son: 247.50±90*	2.35±0.38**	0.29±0.1**	Baş.: 100± 8.94 Son.: 210±24.49**	7±3.2 9±4.8 **

*p<0.0025, **p<0.05

edildi ve alkol ile dehidratasyonu takiben toluolden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan elde edilen 5 mikronluk kesitler PAS + Hemalon boyası ile boyanarak mezangiyal matriks oranları ile ilgili semikantitatif incelemeler için hazırlandı.

Semikantitatif değerlendirme için, Raij ve arkadaşlarının (16) yöntemine göre, her bir sıçandaki 20 böbrek cisimciğinin mezangiyal matriks sahaları "0 ile +4" değerleri arasında derecelendirildi. Daha sonra "(skor (0 - +4) X Aynı skordaki glomerül sayısı/20 + +) X 100 = 1 sıçandaki MM oranı" formülü ile (Tablo IV) deney gruplarındaki mezangiyal matriks oranları hesaplandı.

EM incelemeleri için alınan parçalar ise fosfat tamponu (Ph 7,2) ile hazırlanmış %4'lük glutaraldehit ile daha sonra da aynı tamponla hazırlanmış %1'lik OSO₄ ile fikse edildi. Bu parçalar dehidratasyonu takiben araldit gömme ortamına alındı. Elde edilen bloklardan Reichert UM3 ultramikrotomu ile kesitler alınarak, sırasıyla uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı. Zeiss EM 9 S2 elektron mikroskopunda incelenen parçaların 6000 büyütmede morfolojik değerlendirmeleri yapıldı. Morfolojik ince-

lemeler için Powell H. R'nin (9) yöntemi biraz değiştirilerek periferik bölgelerden 6000 büyütmede çekilen elektron mikrograflarda 6 cm'lik perikapiller glomerüler bazal membran sahasında slit por sayımı yapıldı (Tablo II) (Resim 19).

Bulgular

İdrar, Kan ve Ağırlık Bulguları

Kontrol grubu Wistar sıçanlarda ortalama proteinüri değeri 4.87±3 mg/24 saat bulundu. Kronik grubumuzda, PAN enjeksiyonu öncesinde, ortalama proteinüri bu değere yakın olarak 5.18±2.2 idi. Proteinüri değerleri ortalaması 12. haftada 7. PAN enjeksiyonu sonrasında, anlamlı olarak, yaklaşık 50 kat artarak 247.5±90 mg/24 saate yükselmişti (Tablo I, II).

Serum albümin değerleri ortalaması 3.23±0.1 g/dL'den 2.35±0.38 g/dL'ye, kreatinin klirensi ortalaması ise 0.55±0.8 mL/dak'dan 0.29±0.1 mL/dak'a azalmıştı (Tablo II).

Kontrol grubumuzdaki hayvanların ortalama ağırlıkları, başlangıçta 105±13.78 g iken deney süresinin sonunda 140±15.49'a yükselmiş; kronik grubun ortalaması, başlangıçta 100±8.94 iken fazlaca artarak 210±24.49 g'a yükselmişti (Tablo II).

Tablo III. Deney gruplarının 10 µm glomerüler bazal membran (GBM) sahasında slit por sayıları

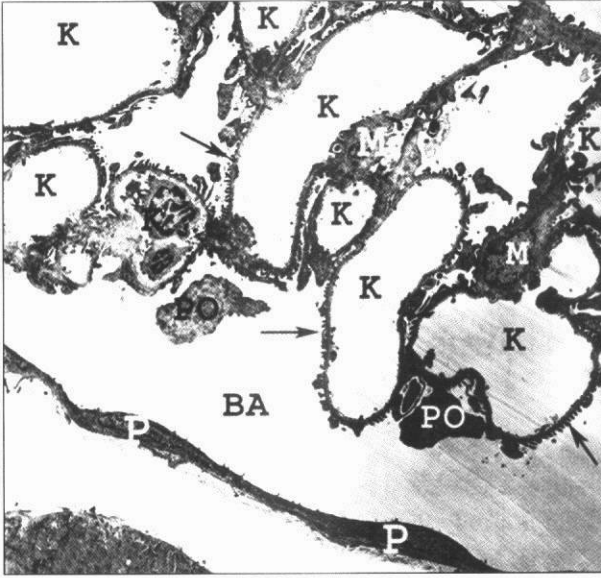
	Slit Por Sayısı (10 µm GBM sahasında)
Kontrol	32.68±0.62
Kronik	4.87±1.45*

*p<0.001

Tablo IV. Deney gruplarının mezangiyal matriks oranları (PAS+HI)

Mezangiyal matriks oranı	
Kontrol	13.33±4.08
Kronik	154.66±44.21**

**p<0.05

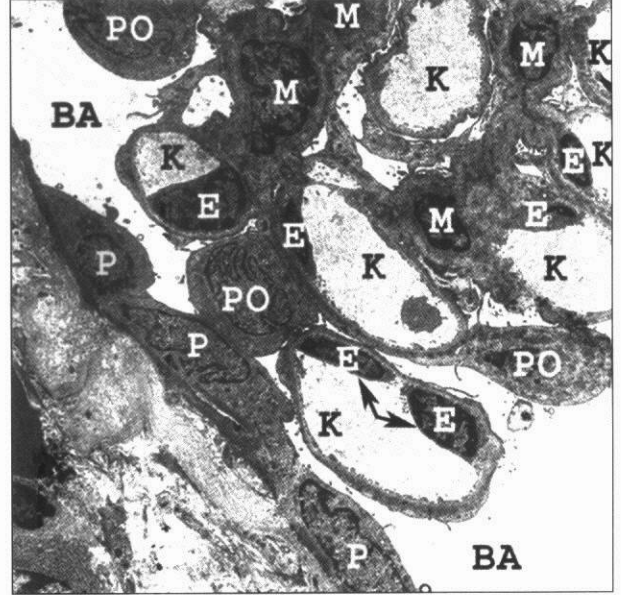


Resim 1. Kontrol grubunda böbrek cisimciğinden bir bölge. P: Pariyetal yaprak, PO: Podosit, K: Kapiller lümeni, M: Mezangiyal hücre, BA: Bowman aralığı, ok: Pedisel x 1600.

Yirmi dört saatlik ortalama idrar volümleri ise kontrol grubumuzda başlangıçta 7.2±2.1 cc iken deney süresi sonunda 11.5±2.3 cc'e yükselmiş; deney grubun ortalaması başlangıçta 7±3.2 cc iken deney süresi sonunda 9±4.8 cc'e yükselmişti (Tablo II).

E.M. Bulguları

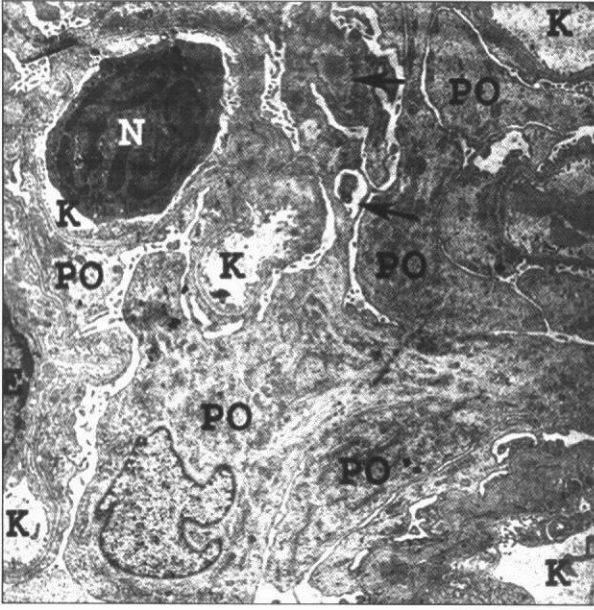
Kontrol grubuna ait böbrek cisimciği Resim 1'de gösterilmiştir. Kronik grubumuzun daha düşük proteinüri gösteren sıçanlarında, endotel hücrelerinde ve pariyetal yaprak hücrelerinde özellikle podositlerin pariyetal yaprak hücreleri ile temasta olduğu (Synechia) sahalarda hiperplaziye rastlandı (Resim 2). Yine bu sıçanlarda hipertrofik podosit ihtiva eden böbrek cisimcikleri sıklıkla görüldü (Resim 3).



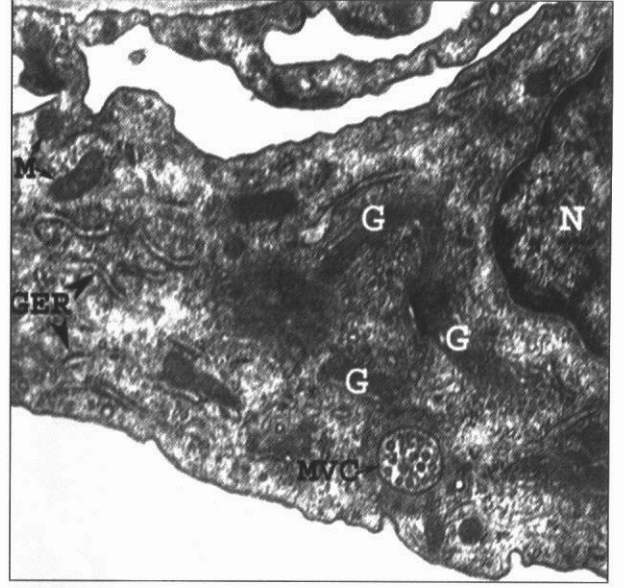
Resim 2. Kronik grupta böbrek cisimciğinde pariyetal yaprak hücresi (P) ve endotel (E) proliferasyonu (ok) gösteren bir bölge. K: Kapiller lümeni, M: Mezangiyal hücre, PO: Podosit, BA: Bowman aralığı, x 2500.

Bu podositler, fazlaca gelişmiş Golgi kompleksi ve bundan oluşan veziküller, granüllü endoplazmik retikulum (GER) sisternaları ve multiveziküler cisimlerden (MVC) oluşan çok zengin strüktüre sahiptiler (Resim 4). Bu podositlerin bazılarında çift nüve görüldü (Resim 5). Glomerüler bazal membranda fokal kalınlaşmalar ve kaynaşmış podosit ayakçığı içine doğru çıkıntı yapan sahalara gözlemlendi (Resim 6).

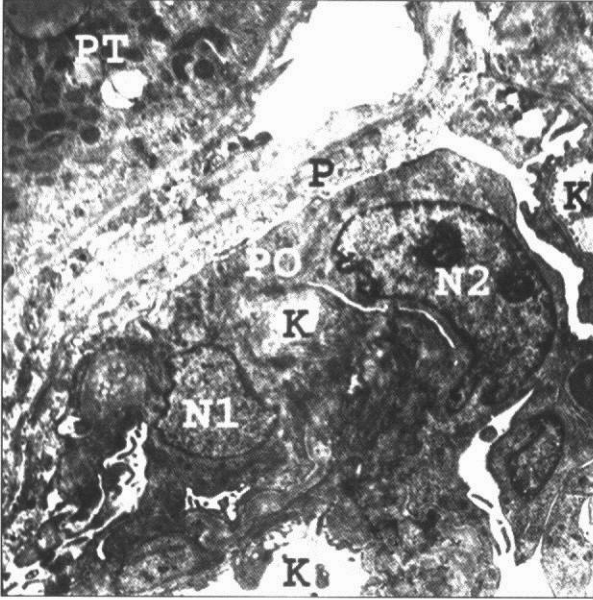
Yüksek proteinüri gösteren sıçanlarda podositlerde psödokistik dejenerasyon (Resim 7), podosit ayakçıklarında fazlaca incelmeye ve uzamaya gözlemlendi (Resim 8). İncelmeye kaynaşmış podosit ayakçığı fazlaca incelmeye GBM üzerinde uzun mesafeler boyunca seyrediyordu (Resim 8,9). Bu podosit ayakçığı membranlarında pinositotik vezikül çöküntüleri-



Resim 3. Kronik grupta hipertrofik ve strüktürden zengin podositler (PO) dikkat çekicidir. K: Kapillerler, E: Endotel, N: Nötrofil, ok: Podositler içinde psödozik yapılar x 2300.

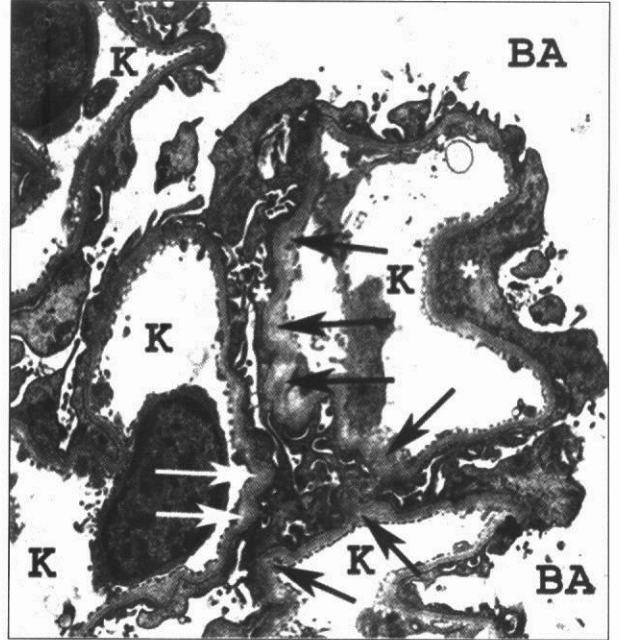


Resim 4. Kronik grupta hipertrofik podositten bir bölge. Fazlaca gelişmiş Golgi kompleksi (G), Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER). M: Mitokondri, MVC: Multiveziküler cisim, N: Nüve, x 15400.

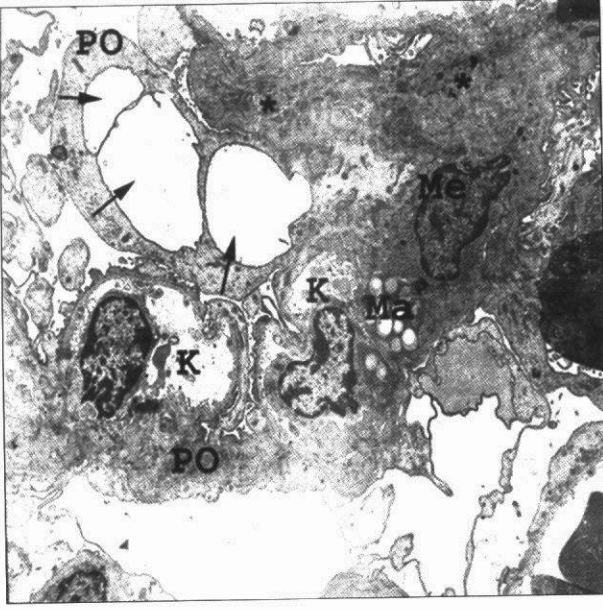


Resim 5. Kronik grupta çift nüveli (N1, N2) podosit (PO). P: Pariyetal yaprak, K: Kapillerler lümeni, PT: Proksimal tübül, x 5400.

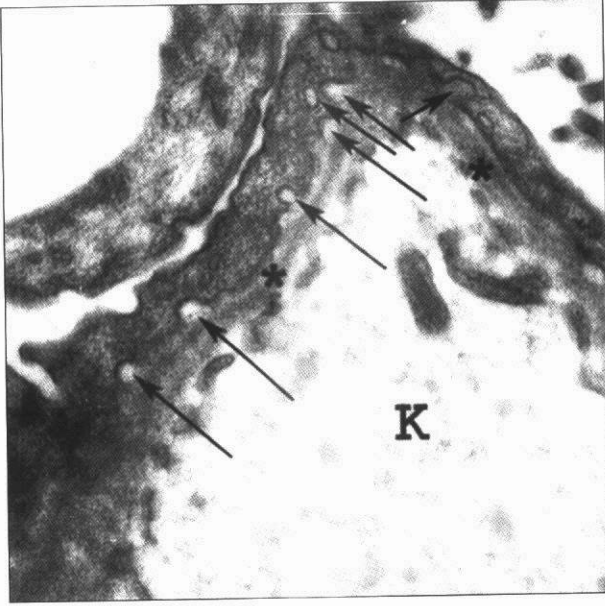
ne ve içinde de pek çok pinositotik veziküllere rastlandı (Resim 9). Bazı sahalarda podosit primer çıkıntılarının fazlaca incelmış ve uzamış olduğu görüldü (Resim 10). İncelmış GBM üzerinde fokal sahalarda podosit ayakçığının ince küçük sitoplazmik parça-



Resim 6. Kronik grupta glomerülden bir bölge. Kaynaşmış podosit ayakçıklarına doğru çıkıntı oluşturan fazlaca kalınlaşmış Glomerüler Bazal Membran (*) dikkat çekicidir (ok). K: Kapiller lümeni, BA: Bowman aralığı, x 4500.

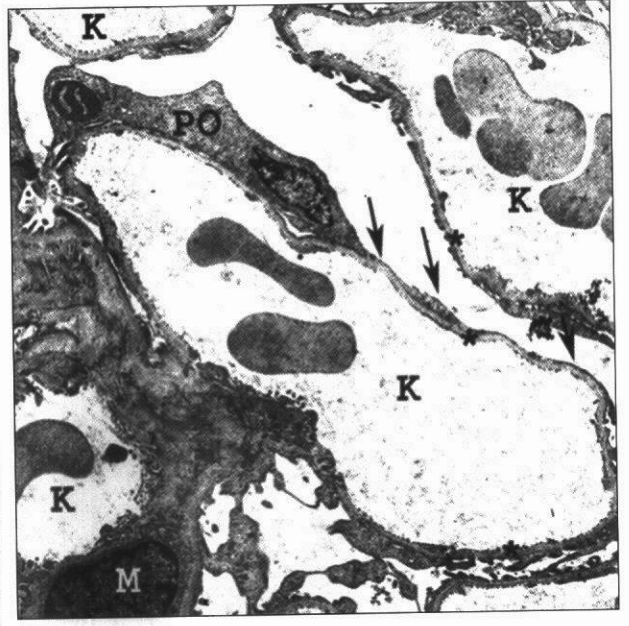


Resim 7. Kronik grupta böbrek cisimciğinde podositlerde (PO) psödokistik dejenerasyon (ok) ve mezangiyal matriks artışı (*) gösteren bir bölge. Ma: Makrofaj, Me: Mezangiyal hücre, K: Kapiller lümeni, x 2700.

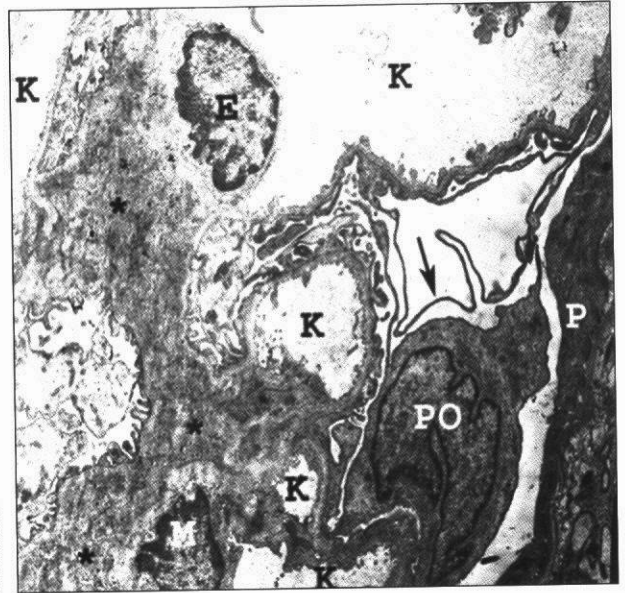


Resim 9. Kronik grupta incelmış ve slit por olmaksızın tek parça halinde uzamış podosit ayakçığında oluşan pinositotik veziküller (ok) ve incelmış glomerüler bazal membran (*) dikkat çekicidir. K: Kapiller lümeni, x 27000.

cıklar halinde aralıklı olarak yerleştiği, slit por membranların kaybolduğu soyulmuş GBM bölgeleri gözlemlendi (Resim 11). Podosit ayakçıklarının tamamıyla kaybolduğu soyulmuş GBM bölgelerine ge-



Resim 8. Kronik grupta böbrek cisimciğinden bir bölge. Fazlaca uzamış ve incelmış glomerüler bazal membran (*) üzerine oturmuş podosit (PO). Bu podositin GBM üzerinde incelmış ve uzun mesafe boyunca slit por membran oluşturmaksızın tek parça halinde uzanan ayakçığı dikkat çekicidir (ok). K: Kapiller lümeni, M: Mezangiyal hücre x 3450.



Resim 10. Kronik grupta böbrek cisimciğinden bir bölge. Fazlaca inceliyor kıvrıntılı bir şekilde uzamış podosit primer çıkıntıları (ok) ve mezangiyal matriks artışı (*) dikkat çekmektedir. M: Mezangiyal hücre, PO: Podosit, E: Endotel, P: Pariyetal yaprak, x 3100.



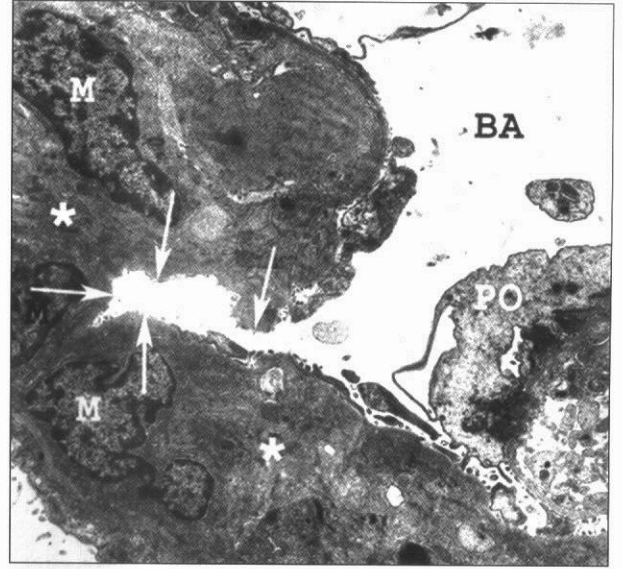
Resim 11. Kronik grupta incelmis glomerüler bazal membran (*) üzerinde podosit ayakçıklarının çok aralıklı küçük sitoplazmik parçacıklar halinde yerleştiği (ok) bir bölge. Slit por membranların kaybolması dikkat çekicidir. K: Kapiller lümeni, x 15400.

nellikle perimezangiyal GBM bölgelerinde rastlandı (Resim 12). Bu sahalarla yakın mezangiyal matriks fazlaca artmış ve elektrondens bir görünüm kazanmıştı (Resim 7,12). Artmış mezangiyal matriks içinde apoptotik görüntüler gösteren mezangiyal hücelere (Resim 13,14) ve interstisyel kolajene (Resim 15) sıklıkla rastlandı. Endotel hücrelerinde de sıklıkla apoptotik görüntüler gözlemlendi (Resim 16). Makrofajların böbrek cisimciği dışındaki interstisyel sahadan cisimciğin pariyetal yaprak hücreleri arasından böbrek cisimciğine girdiği görüntüler saptandı (Resim 17). Mezangiyal matriks içinde de makrofajlar sıklıkla gözlemlendi (Resim 7,18).

Morfometrik Bulgular

Yaptığımız morfometrik çalışmada 10 µm uzunluğundaki GBM sahasında slit por sayısı ortalaması kontrol grubunda 32.68 ± 0.62 idi. Kronik grubumuzda ise anlamlı olarak 4.87 ± 1.45 azalmıştı (Tablo III). Kontrol ve kronik grubun 10 µm uzunluğundaki GBM sahası Resim 19'da gösterilmiştir.

Deney gruplarındaki sıçanların böbrek cisimciğinde Raji ve arkadaşlarının (16) yöntemine göre semikantitatif olarak hesaplanan ortalama mezangiyal matriks oranı, kontrol grubunda 13.33 ± 4.08 iken,

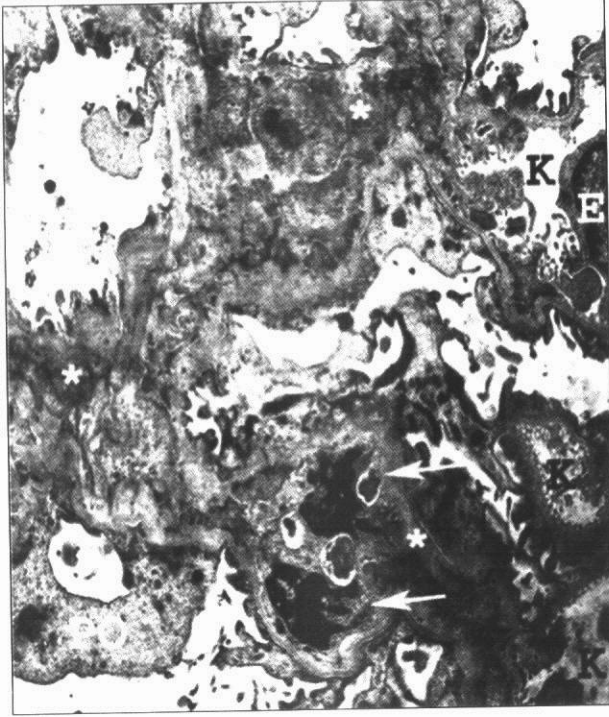


Resim 12. Kronik grupta fazlaca mezangiyal matriks artışı (*) gösteren bir bölge. Mezangiyal matriks elektrondens bir görüntüde olup, perimezangiyal glomerüler bazal membranda podosit çıkıntılarının harabiyeti neticesi soyulmuş sahalar (ok) dikkat çekicidir. BA: Bowman aralığı, PO: Dejeneratif podosit, M: Mezangiyal hücre, x 4500.

kronik grupta fazlaca artarak 154.66 ± 44.21 'e yükselmişti (Tablo IV). PAS+Hemalon boyası ile boyanan kesitlerde, ışık mikroskopu ile sıçan böbrek cisimciklerindeki semikantitatif mezangiyal matriks skorlama örnekleri (0 - +4) Resim 20'de gösterilmiştir.

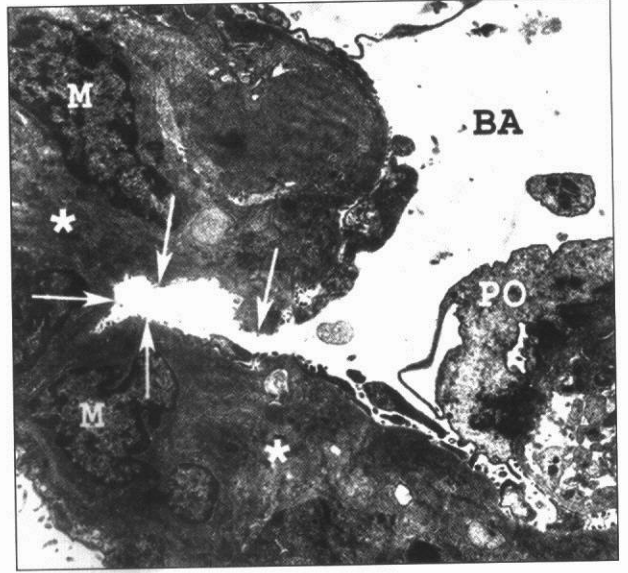
Tartışma

Kronik grubu oluşturan sıçanlarda proteinüri değerleri ortalamasının anlamlı olarak 50 kat artması, serum albümin ve kreatinin klirensi azalması ve sıçan ağırlıklarında iki kattan fazla artış bozulmuş bir renal fonksiyon (ilerlemiş bir nefrotik sendrom) bulguları olarak değerlendirildi. Bu sıçanların dört tanesinde proteinüri değerleri 250 mg/24 saatin altında kalırken, (140–246 mg/24 saat) iki sıçanda ise bunun üstündeydi (314–377 mg/24 saat). Biz sıçan gruplarının EM değerlendirmelerinde değişik dejenerasyon safhasında olan böbrek cisimcikleri gözledik. Düşük proteinüri gösteren sıçanların birçok böbrek cisimciğinde, yüksek proteinüri gösterenlerin ise bir kısmında fazlaca hipertrofik podositler mevcuttu. Bu hipertrofik podositlerin uzantılarının yer yer slit por kesintisine uğramaksızın GBM'yi sardığını gözledik. GBM'lerde lokal kalınlaşma bölgelerine de rastlandı. Bu hipertrofik podositler fazlaca



Resim 13. Kronik grupta böbrek cisimciğinde fazlaca mezangiyal matris artışı (*) ve bu sahaya yerleşmiş apoptotik mezangiyal hücreler (ok) gösteren bir bölge. K: Kapiller lümeni, PO: Dejeneratif podosit, E: Endotel, x 14500.

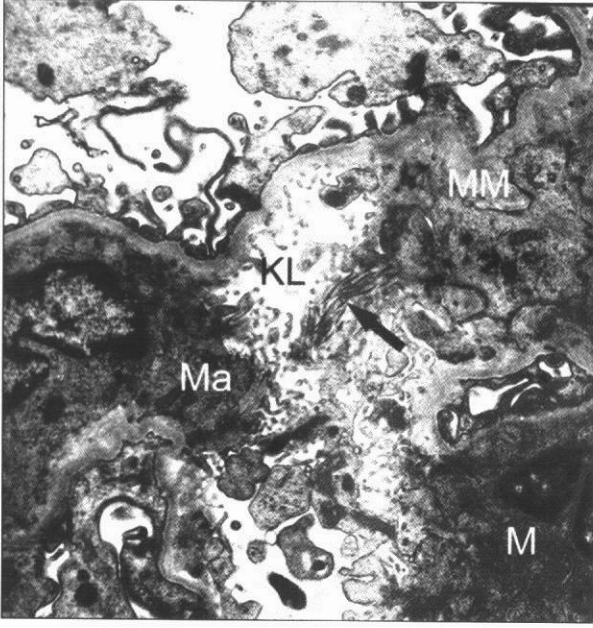
strüktürden zengin görünümdeydi. Özellikle, çok iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve GER ile multiveziküler cisimlere sahiptiler. Daha önceki yayınlarda (13) akut PAN grubunda podositler içinde sıklıkla rastladığımız protein absorpsiyon granülalarına (PAG) genellikle rastlanmadı. Bu hipertrofik podositlerin bazılarında iki nüve gözledik. Podositler bölünmek için sınırlı kapasiteye sahip, fazlaca farklılaşmış hücrelerdir. Belirli şartlar altında hücre bölünmesiyle sonuçlanmayan, sadece nüve bölünmesinden ibaret olan mitozis geçirmektedirler (5,17,18). Böylelikle, bu çift nüveli strüktürden zengin podositler bize bu hücrelerin PAN indüksiyonu neticesi nüve bölünmesinden ibaret bir mitozis geçirdiğini, diğer hipertrofik podositlerin de ya böyle bir bölünme için hazırlık aşamasında olduğu ya da diğer nüveden geçmemiş kesitleri olduğunu bize düşündürdü. Yaralanmayı takiben podositlerin çoğalmak ve kaybolan hücreleri yerine koymak yetersizliklerini ilerleyen glomerüloskleroze yol açan bir faktör olabileceği desteklenmiştir (19). Biz de önceki çalışmamızda apoptotik podositlerin varlığını akut PAN nefrozda göstermiştik (13). Bu tip hipertrofik podositlere sa-



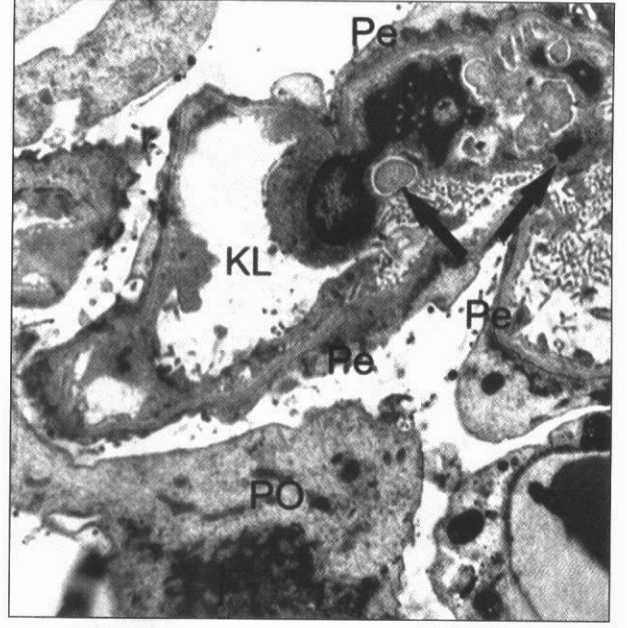
Resim 14. Kronik grupta artmış mezangiyal matris (*) içinde apoptotik özellik gösteren mezangiyal hücreler (ok). K: Kapiller lümeni, x 9500.

hip glomerüllerde artmış bir mezangiyal matris görüntüsüne rastlanmadı. Podositlerin pariyetal yaprak hücreleriyle temasta olduğu bölgelerde pariyetal yaprak hücrelerinde hiperplazi gözlemlendi. Yapılan çalışmalarda pariyetal yaprak hücre proliferasyonlarının genellikle podositlerin bu hücrelere adhezyon yerlerinde gözlemlendiği bildirilmiştir (20,21). Podositlerin pariyetal yaprak hücrelerinin proliferasyonunu etkileyen büyüme faktörleri salgıladığı ve özellikle FGF 2'nin *in vitro* çalışmalarda epitel hücrelerinde proliferatif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (22,23). Gerçekten de bu hücrelerin strüktürden fazlaca zengin görüntüleri çeşitli sitokinlerin sentez ve sekretine uygun bir ultrastrüktürel yapılanmayı desteklemektedir. Yakın yıllardaki çalışmalarda podositlerin ürettikleri çeşitli sitokinlerde glomerüler hastalığın ilerlemesinde ilk adım olabileceğini desteklemektedir (17,24-27).

GBM üzerindeki slit por sahaları fazlaca azalmış ve podosit ayakçıkları GBM üzerinde uzun mesafelere kadar kesintisiz bir şekilde uzanıyordu. Yaptığımız morfometrik çalışmada 10 µm'luk GBM sahasındaki slit por sayısında kontrol gruba göre anlamlı olarak, belirgin düzeyde azaldığını (32.68 ± 0.62 'den 4.87 ± 1.45 'e) tespit ettik. Bundan önceki çalışmamızda oluşturduğumuz akut PAN grubumuzda da proteinüri artışı ile birlikte slit porlarda buna benzer belirgin bir azalma tespit etmiştik (13). Birçok araştırmacı da bizim çalışmamıza benzer şekilde patolojik



Resim 15. Kronik grupta mezangiyal matriks (*) içinde interstisyel kolajen (ok) içeren bir bölge. Resmin sağ üst kenarında apoptotik özellik gösteren bir mezangiyal hücre (M) görülmektedir. E: Endotel, K: Kapiller lümeni x 9500.



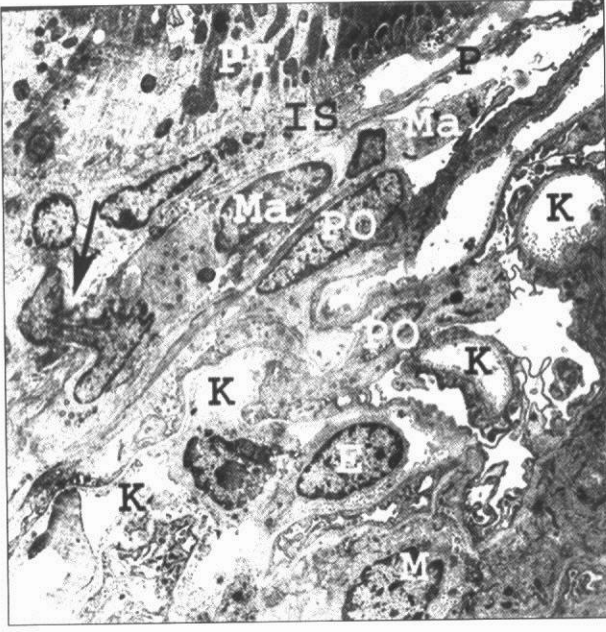
Resim 16. Kronik grupta glomerüler kapillerde apoptotik özellik gösteren endotel hücresi (ok) içeren bir bölge. K: Kapiller lümeni, BA: Bowman aralığı, x 6600.

şartlarda slit por membran sayısının azalmasını ve proteinüri artışını tespit etmişler ve bunun azalan bir glomerüler hidrolitik permeabilite ile birlikte olduğunu desteklemişlerdir (4,9,28,29). Biz de bu çalışmalarını destekler şekilde kronik grupta azalan kreatinin klirensi ve proteinüri artışı gözledik.

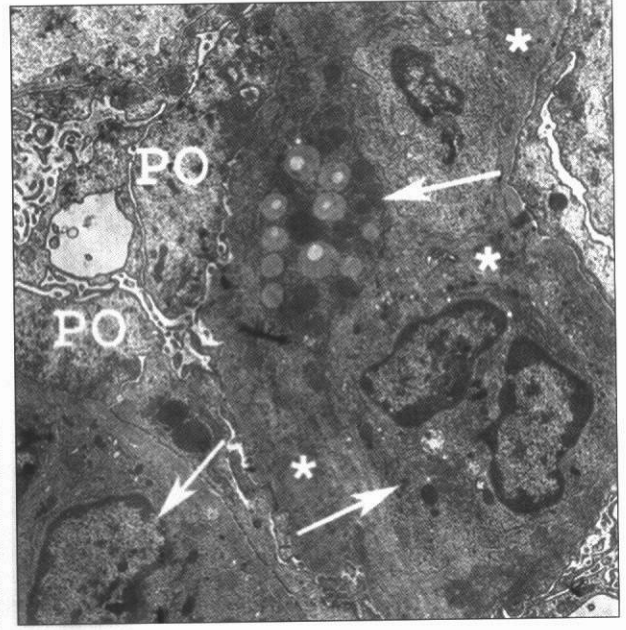
Soyulmuş GBM bölgelerine sıklıkla rastlandı. Bu soyulmuş bölgeler özellikle perimezangiyal GBM bölgelerinde fazlaca görüldü. Yapılan çalışmalarda albümin, transferin ve İgG'nin GBM'den geçmesine rağmen moleküler ağırlığı daha fazla olan İgM'nin kapillerlerin daha ince bazal membrana sahip jukstamezangiyal bölgesinden mezangiyal matrikse geçtiği gösterilmiştir (30). Böylelikle, soyulmuş perimezangiyal GBM bölgelerinin mezangiyal matrikse birikmiş moleküler ağırlığı fazla olan İgM'lerin ürine direkt geçiş bölgeleri olarak değerlendirildi ve yükselen proteinüriden sorumlu olabileceğini düşündük. Bu mezangiyal matriks sahalarında fazlaca artmış elektrodens görünüm de bizim bu düşüncemizi desteklemektedir. Çeşitli araştırmacılar da GBM'nin soyulması ile proteinürinin gelişmesi arasında ilişki kurmuşlar (8, 31,32) ve GBM soyulmasının sklerozise yol açan son yakın mekanizma olduğunu ifade etmişlerdir

(5). Biz de çalışmamızda özellikle soyulmuş perimezangiyal GBM bölgelerine yakın fazlaca artmış mezangiyal matrikse rastladık. Daha önceki çalışmamız da bu bulguları destekleyen neticeler elde etmiştir (13). Bu çalışmadaki bulgularımız da bunlarla paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda yüksek proteinüri gösteren sıçanlarımızda podositlerde dejenerasyon psödokist oluşması, hücre gövdesi incilmesi, primer çıkıntılarının uzaması ve incilmesi, GBM incilmesi, mezangiyal matriks artışı, mezangiyal hücrelerde (MC) azalmayla birlikte, MC'lerde ve endotel hücrelerde apoptotik görüntülere ve mezangiyal matrikste makrofajlara rastladık. Yaptığımız semikantitatif çalışmada (16) mezangiyal matriks oranının kronik grubunda anlamlı bir şekilde fazlaca arttığını tespit ettik. Yapılan çeşitli deneysel ve insan glomerüler hastalıklarıyla ilgili çalışmalarda, hastalık ilerlemesiyle birlikte artan MC apoptozisi gözlenmiştir (33-36). Böylece MC apoptozisinin, glomerüler hücre proliferasyonunun büyüklüğünü kontrol eden fazlaca çoğalmış istenmeyen MC'leri temizleyen ve hücre miktarının homeostazisinin sürdürülmesini sağlayan bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (37). Normal Ekstra Selüler Matriksin (ECM) de MC için yaşamsal faktör olarak hizmet ettiği, MC'de apoptozisi önlediği belirtilmiştir



Resim 17. Kronik grupta pariyetal yaprak hücreleri arasında, interstisyel sahadan böbrek cisimciği içine geçmekte olan bir makrofaj (ok) dikkat çekicidir. Ma: Böbrek cisimciği içinde makrofajlar, P: Pariyetal yaprak, E: Endotel, M: Mezangiyal hücre, PO: Podosit, K: Kapiller lümeni, PT: Proksimal tübül, IS: İnterstisyel saha, x 2700.

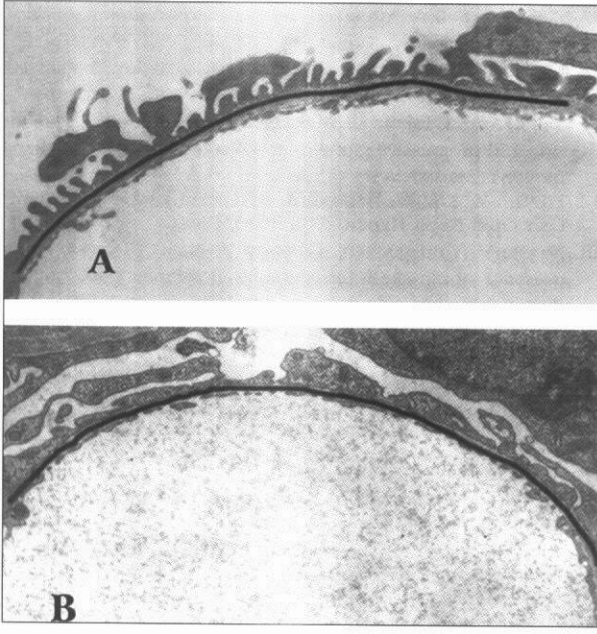


Resim 18. Kronik grupta artmış mezangiyal matriks (*) içinde makrofajlar (ok). PO: Podosit, x 4500.

(37). MC apoptozisinin yaralanmadan sonra glomerüller ECM değişiklikleri, yeniden modellenmesi ve β_1 integrin değişiklikleri ile ortaya çıktığı, böylelikle MC yaşam ve ölümünün integrin molekülleriyle sınırlan ECM vasıtasıyla düzenlendiği desteklenmiştir (35-39). Biz de çalışmamızda sıklıkla rastladığımız podosit ayakçıklarının kaybolduğu çıplaklaşmış GBM bölgelerinin bozulmuş integrin mezangiyal matriks ilişkisinden sorumlu bölgeler olabileceğini düşündük. Hastalık durumlarında sadece artan ECM komponentlerinin değil, özellikle normal glomerülde bulunmayan interstisyel kolajenin de (Tip I, III) apoptotik indüksiyonda etkili olabileceği düşünülmüştür (40-43). Biz de çalışmamızda interstisyel kolajen olarak değerlendirdiğimiz kolajen lif kesitlerini EM'de gözledik (Resim 15). Glomerüller hasardan sonra MC'ler kendi fenotipik değişiklikleri ile bu çeşitli tip interstisyel kolajeni üretebilmektedirler (38,40-43). MC apoptozisinin moleküler mekanizmasındaki proapoptotik yaşamsal faktörler olarak bir kısım araştırmacı MC proliferasyonunun ve mezangiyal matriks genişlemesinin medyatörleri olarak PDGF ve TGF- β 'ya da bir rol yüklemişlerdir (44). Si-

tokin stimülasyonundan sonra MC tarafından hasıl edilen süperoksit (O_2^-), NO gibi inflamatuvar medyatörlerin ayrı ayrı olarak MC'de apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (45). MC apoptozisinin mezangiyoproliferatif glomerülonefritisin çözümünde (33,34) ve glomerülosklerozis ilerlemesinde (35,46) önemli olduğu raporu edilmiştir.

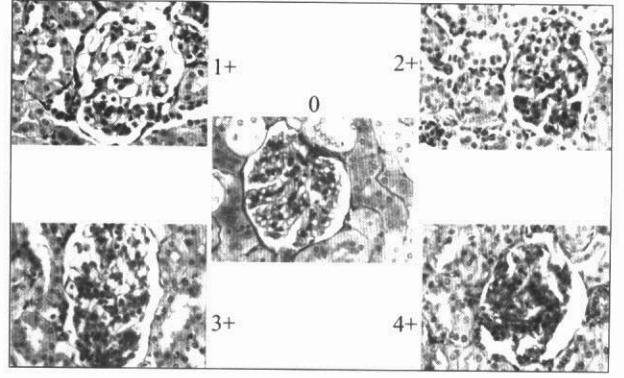
Yapılan çalışmalarda makrofajların proteinüri ve mezangiyal hücre proliferasyonu ile belirlenen renal yaralanmayı indükleyebileceği (47) ve glomerüller makrofaj yığılımındaki azalmanın proteinürinin inhibisyonu ile birlikte olduğu ifade edilmiştir (48-50). Biz de çalışmamızda, istatistiksel değerlendirme yapmamakla birlikte, az ve çok proteinüri gösteren sıçanlarımızda makrofajlara rastladık. Bu makrofajların böbrek cisimciği dışındaki interstisyel sahadan pariyetal yaprak hücreleri arasından geçerek böbrek cisimciği içine girdiğini gösteren görüntülere rastladık (Resim 17). Ancak istatistiksel bir analiz yapmadığımız için, proteinüri ile makrofajlar arasındaki ilişki üzerine bir yorum yapamadık. Ayrıca bilindiği gibi makrofajlar tarafından IL-1, IL 6, PDGF, TNF- α , TGF- β , PDECGF gibi çeşitli medyatörlerin üretildiği belirtilmiştir (51-56). Böylece makrofajlardan türemiş ürünler mezangiyal hücre proliferasyonunun, ECM sentezinin ve özellikle kolajen sentezini stimüle ederek glomerülosklerozis işlemine direkt katkıda bulunabileceği (57,58) ve böylelikle makrofajların glome-



Resim 19. Kontrol (A) ve Kronik nefroz (B) gruplarında da 10 µm GBM sahasında (siyah çigi) slit por sayımı. x 6000.

rülde yerleşmesi ve aktivasyonunun nefropatinin ilerlemesinde rol oynayabileceği desteklenmiştir (59).

Podosit ayakçıkları α aktin, α aktinin ve miyozin ihtiva eden kontraktıl bir sisteme sahiptir ve böylece perikapiler GBM'nin genişlemesine karşı koyabilmektedir (60,61). Hipertrofik podositlerin gözleendiği sıçanlarımızda genişlemiş ve fazlaca invaginasyon göstermeyen glomerüler kapiller lümenleri bulgularımız da bu neticeleri desteklemektedir. Yüksek proteinüri gösteren sıçanlarımızdaki podositlerde psödokist oluşması, hücre gövdesi incilmesi, primer çıkıntılarının incilmesi ve uzaması bulgularımız ise artmış mekanik karşı koyma ile ortaya çıkan podosit yetersizliğinin erken bir safhası olarak ifade edilmiştir (33). Yapılan çalışmalarda PAN uygulamasından sonra podositlerdeki hasarın muhtemelen reaktif oksijen türevlerinin (ROS) aktive olmasıyla (62,63) en fazla podosit sklerotonunda meydana geldiği ve direkt hücre hasarının da podositlerin negatif yüklü glikokaliksini nötralize eden katyonik bileşiklerin infüzyonuna cevap olarak oluştuğu belirtilmiştir (64). GEC vasitısıyla albumin ve diğer plasma proteinlerinin artmış alımı proteinürik durumda ortaya çıkar ve H_2O_2 üretimine neden olur. H_2O_2 'de filtrasyon bariyerinin selüler komponentleri üzerinde yaralayıcı bir etkiye sahiptir (62,63). Biz de kronik grubun yüksek prote-



Resim 20. PAS + Hemalona boyası ile böbrek cisimciğinde, semikantitatif mezangiyal matriks skorlama (0- +4) örnekleri.

inüri gösteren sıçanlarında sıklıkla incelmış GBM ve onun üzerindeki GBM'ye bakan yüzünde pek çok pinositotik veziküller içeren fazlaca incelmış podosit ayakçık kaynaşmaları/çekilmeleri gözledik ve bu sahaların soyulmuş GBM bölgeleri ile birlikte yüksek proteinüriden sorumlu bölgeler olabileceğini düşündük.

Bulgularımız bize; 1-Gelişen nefroz başlangıcında, böbrek cisimciğini oluşturan tüm hücrelerde (pariyetal yaprak hücreleri, podosit, mezangiyal hücreler, endotel hücreleri) artan mitotik bir aktivite görüldüğünü, 2-Ancak podositlerin diğer hücrelerden farklı olarak gelişen kronik nefroza karşı hücre bölünmesiyle tamamlanmayan, sadece nüve bölünmesinden oluşan bir mitozaya girmek için strüktürden zengin hipertrofik görüntüler kazandığını, 3-Podosit ayakçıklarının kaynaşma/çekilmesi neticesi slit por sayısının fazlaca azaldığını ve bu azalan slit por sayısı ile proteinüri artışı, serum albumin, kreatinin klirensi azalması arasında ilişki olduğunu, 4-Kronik nefrozis ilerlemesiyle podositlerde aşırı dejenerasyon neticesi psödokistik yapıların görüldüğü ve böylelikle sitoplazmik kayba uğrayan podositlerin incelişip uzadığını, 5-Kaynaşmış/çekilmiş podosit ayakçıklarının fazlaca incelendiği, bunların yer yer ortadan kalkarak çıplaklaşmış GBM bölgelerinin ortaya çıkmasına neden oldukları ve bu bölgelerin yüksek proteinüriden sorumlu bölgeler olduğunu, 6-İlerleyen nefrozla birlikte, GBM incelmelerinin, mezangiyal hücreler ve endotel hücrelerinde apoptozisin, mezangiyal hücre azalmasının, mezangiyal matriks artışının ve içinde interstisyel kolajenin oluşumunun ve bu artmış mezangiyal matriks içine makrofajların göçünün indüklendiğini düşündürmektedir.

Neticelerimiz, kronik PAN uygulanmasının böbrek cisimciğinde bozulan renal fonksiyon ile ilişkili olarak, podosit dejenerasyonu, slit por azalması ve podosit ayakçıklarının yok olması (GBM çiplaklaşması), GBM incilmesi, mezangiyumda; mezangiyal matriks (MM) artışı, interstisyel kolajen belirginleşmesi, MC ve endotel hücre apoptozisi ve makrofajların göçü bulgularıyla birlikte seyreden bir nefrotik sendromu indüklediğini düşündürmektedir.

Kaynaklar

1. Kriz W, Gretz N, Lemley K. V. Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 1998, 54: 687-697.
2. Kerjaschki D. Dysfunctions of cell biological mechanisms of visceral epithelial cell (podocytes) in glomerular diseases. *Kidney Int* 1994, 45: 300-313.
3. Kim Y.O, Goyal M, Kumit D, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, Kesrhaw D, Wiggins R. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int* 2001, 60:957-968.
4. Rennke H. G. How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage? *Kidney Int* 1994, 45: Suppl.45, pp. S 58-S 63.
5. Kriz W, Elger M, Nagata M, Kretzler M, Uiker S, Hagemann K. I, Tenschert S, Lemley K. V. The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1994, 45: Suppl.42, pp. S 64-S 72.
6. Laurens W, Battaglia C, Foglieni C, Devos R, Malanchini B, Van Demma B, Vanrenterghem Y, Remuzzi G, Remuzzi A. Direct podocyte damage in the single nephron leads to albuminuria in vivo. *Kidney Int* 1995, 47: 1078-1086.
7. Daniels BS, Deen WM, Mayer T, Hostetter TH. Glomerular permeability barrier in the rat. Functional assessment by in vitro methods. *J Clin Invest* 1993, 92:929-936.
8. Whiteside C, Prudis K, Cameron R, Thompson J. Glomerular epithelial detachment, not reduced charge density, correlates with proteinuria in adriamycin and puromycin nephrosis. *Lab Invest* 1989; 61:6, 650-660.
9. Powell HR. Relationship between proteinuria and epithelial cell changes in minimal lesion glomerulopathy, *Nephron* 1976; 16: 310-317.
10. Seefeldt T, Bohman SO, Gundersen HJG, Maunsbach AB, Petersen VP, Olsen S. Quantitative relationship between glomerular foot process width and proteinuria in glomerulonephritis. *Lab Invest* 1981; 44: 6, 541-554.
11. Krishnamurti U, Zhou B, Fan WW, Tsilibary E, Wayner E, Kim Y, Kashtan CE, Michael A. Puromycin aminonucleoside suppresses integrin expression in cultured glomerular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001, Apr: 12 (4): 758-66.
12. Sanwal V, Pandya M, Bhaskaran M, Franki N, Reddy K, Ding G, Kapasi A, Valderrama E, Singhal PC. puromycin aminonucleoside induces glomerular epithelial cell apoptosis. *Exp Mol Pathol* 2001, Feb; 70 (1): 54-64.
13. Seçkin İ, Uzunalan M, Pekpak M, Köktürk S, Uruluer B, Sönmez H, Öztürk Z, Şatıroğlu G. Akut puromycine aminonucleoside nefrozda proteinüri, kreatinin klirensi, serum albumin değerleri ile böbrek cisimciğindeki ultrastrüktürel değişiklikler ve slit-pore sayısı arasındaki ilişkiler. *Cer Tıp Der* 2004, 35 (3): 102-114.
14. Marinides GN, Groggel GC, Cohen AH, Border WA. Enalapril and low protein reserve chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *Kidney Int* 1990, 37:749-757.
15. Kaplan LA, Pesce AI. Clinical chemistry methods of analysis; 1984, 1322-1323.
16. Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 1984, 26, 137-143
17. Endlich K, Kriz W, Witzgall R. Update in podocyte biology. *Curr Opin Neph Hypert* 2001, 10: 331-340.
18. Nagata M, Yamaguchi Y, Komatsu Y, Ito K. Mitosis and the presence of binucleate cells among glomerular podocytes in diseased human kidneys. *Nephron* 1995, 70: 68-71.
19. Kriz W. Progressive renal failure – Inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 1996, 11:1738-1742.
20. Nagata M, Kriz W. Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. *Kidney Int* 1992, 42: 148-160.
21. Kihara I, Yaoita E, Kawasaki K, Yamamoto T. Cellular process of glomerular adhesion in aged rats. *Acta Med Biol* 1990, 34 (Suppl 2): 69-80.
22. Takeuchi A, Yoshizawa N, Yamamoto M, Sawasaki Y, Oda T, Senoo A, Niwa H, Fuse Y. Basic fibroblast growth factor promotes proliferation on rat glomerular visceral epithelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1992, 141: 107-116.
23. Sasaki T, Jyo Y, Tanda N, Kawakami Y, Nohno T, Tamai H, Osawa G. Changes in glomerular epithelial cells induced by FGF2 and FGF2 neutralizing antibody in puromycin aminonucleoside nephropathy. *Kidney Int* 1997, 51:301-309.
24. Budde K, Neumayer HH, Salant DJ, Cybulsky AV, Coleman DL, Sterzel RB. Glomerular epithelial cell products stimulate mesangial cell proliferation in culture. *Kidney Int.* 1994, Suppl 45: 58-63.
25. Moriako Y, Koike H, Ikezumi Y, Ito Y, Oyanagi A, Gejyo F, Shimizu F, Kawachi H. Podocytes injuries exacerbate mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 2001, 60: 2192-2204.
26. Castellot JJ, Hoover RL, Harper PA, Karnovsky MJ. Heparin and glomerular epithelial cell secreted heparin-like species inhibit mesangial-cell proliferation. *Am J Pathol* 1985; 120: 427-435.
27. Floege J, Johnson Rj, Alpers Ce, Fatemi-Nainie S, Richardson Ca, Gordon K, Couser WG. Visceral glomerular epithelial cells can proliferate in vivo and synthesize platelet-derived growth factor B-chain. *Am J Pathol* 1993; 142: 637-650.
28. Bohmann S-O, Jaremkov GB, Berg U. Foot process fusion and glomerular filtration rate in minimal change nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1984, 25: 696-700.
29. Daniels BS. The role of the glomerular epithelial cell in the maintenance of the glomerular filtration barrier. *Am J Nephrol* 1993; 13: 318-323.
30. Rydel JJ, Schwartz MM, Singh AK. Sequential localization of antibody to multiple regions of the glomerular capillary wall in passive Heymann nephritis. *Lab Invest* 1989; 60: 492-498.
31. Messina A, Davies DJ, Dillane PC, Ryan GB. Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1987; 126: 220-229.
32. Shirato I, Sakai T, Kimura K, Tomino Y, Kriz W. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *Am J Pathol* 1996; 148 (4): 1283-96.
33. Baker AJ, Money A, Hughes J, Lombardi D, Johnson RJ, Savil J. Mesangial Cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental me-

- sangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 1994; 94: 2105-2116.
34. Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1995; 47: 114-121.
 35. Sugiyama H, Jashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota Z. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1996; 49: 103-111.
 36. Makino H, Kashihara N, Sugiyama H, Sekikawa T, Ota Z. Role of apoptosis in the progression of glomerulosclerosis, edited by Koide H, Ichikawa I. *Progression of chronic renal diseases contrib nephrol*, Basel karger, 1996; 118: 41-47.
 37. Sugiyama H, Kashihara N, Maeshima Y, Okamoto K, Kanao K, Sekikawa T, Makino H. Regulation of survival and death of mesangial cells by extracellular matrix. *Kidney Int* 1998; 54: 1188-1196.
 38. Savill J, Johnson RJ. Glomerular remodelling after inflammatory injury. *Exp Nephrol* 1995; 149-158.
 39. Savill J, Mooney A, Hughes J. Apoptosis and renal scarring. *Kidney Int* 1996;49 (Suppl 51): 14-17.
 40. Johnson RJ. The Glomerular response to injury: Progression or resolution? *Kidney Int* 1994;45: 1769-1782.
 41. Johnson RJ, Flöge J, Yoshimura A, Iida H, Couser WG, Alpers CE. The activate mesengial cell: a glomerular 'myofibroblast'? *J Am Soc Nephrol* 1992;2: 190-197.
 42. Makino H, Shikata K, Wieslander J, Wda J, Kashihara N, Yoshioka K, Ota Z. Localization of fibril/microfibril and basement membrane collagens in diabetic glomerulosclerosis in type 2 diabetes. *Diabet Med* 1994;11:304-311.
 43. Makino H, Kashihara N, Sugiyama H, Kanao K, Sekikawa T, Okamoto K, Maeshima Y, Ota Z, Nagai R. Phenotypic modulation of the mesengium reflected by contractile proteins in diabetes. *Diabetes* 1996;45: 488-495.
 44. Johnson R, Lovett D. In vivo gene transfer, Koch's postulates, and renal disease. *J Clin Invest* 1993;92:2568-2577.
 45. Sandau K, Pfeilschifter J, Brüne B. Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int* 1997, 52: 378-386.
 46. Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Apoptosis in progressive crescentic glomerulonephritis. *Lab Invest* 1996, 74: 941-951.
 47. Ikezumi Y, Hurst LA, Masaki T, Atkins RC, Nolic-Paterson DJ. Adoptive transfer studies demonstrate that macrophages can induce proteinuria and mesangial cell proliferation. *Kidney Int* 2003, 63: 83-95.
 48. Tang WW, Qi M, Warren JS. Monocyte chemoattractant protein 1 mediates glomerular macrophage infiltration in anti-GBM Ab GN. *Kidney Int* 1996, 50: 665-671.
 49. Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, et al. Rantes and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 1997, 185: 1371-1380.
 50. Panzer U, Thaiss F, Zahner G, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and osteopontin differentially regulate monocytes recruitment in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 2001, 59: 1762-1769.
 51. Johnson R, Iida H, Yoshimura A, Floege J, Bowen-Pope DF. Platelet-derived growth factor: A potentially important cytokine in glomerular disease. *Kidney Int* 1992, 41: 590-594.
 52. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987, 79: 319-326.
 53. Yakahashi Y, Bucana CD, Akagi Y, Liu W, Cleary KR, Mai M, Ellis LM. Significance of platelet-derived endothelial cell growth factor in the angiogenesis of human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1998, 4 (2): 429-434.
 54. Saito S, tsuno NH, Sunami E, Hori N, Kitayama J, Kazama S, Okaji Y, Kawai K, Kanazawa T, Watanabe T, Shiba Y, Nagawa H. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 2003, 38 (3): 229-237.
 55. Fox SB, Moghaddam A, Westwood M, Turley H, Bicknell R, Gatter KC, Harris AL. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *J. Pathol* 1995, 176 (2): 183-190.
 56. Saito S, Tsuno N, Nagawa H, Sunami E, Zhengxi J, Osada T, Kitayama J, Shibata Y, Tsuruo T, Muto T. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor correlates with good prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 2000, 88: 42-49.
 57. Melcion C, Lachman L, Killen PD, Morel-Maroger L, Striker GE. Mesangial cells, effect of monocyte products on proliferation and matrix synthesis. *Transplant Proc* 1982, 141: 559-564.
 58. Davies M, Shewring L, Thomas G, Jenner L. Stimulation of proteoglycan (PG) Synthesis in rat mesangial cells (RMC) in response to tumor necrosis factor (TNF). *Kidney Int* 1989, 35: 344.
 59. Ligtenberg G, Blankestijn J, Oey L, et al. Reduction of sympathetic hyperactivity by enalapril in patients with chronic renal failure. *N Engl J Med* 1999, 340:1321-1328.
 60. Direnckhahn D, Franke PR. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Invest* 1988, 59: 673-682.
 61. Johnson RJ, Iida H, Alpers CE, Majesky MW, Schwartz SM, Pritzl P, Gordon K, Gown AM. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. *J Clin Invest* 1991, 87: 847-858.
 62. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Antioxidants protect podocyte foot processes in puromycin aminonucleoside-treated rats. *J Am Soc Nephrol* 1994, 4: 1974-1986.
 63. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Reactive oxygen species in puromycin aminonucleoside nephrosis: In vitro studies. *Kidney Int* 1997, 45: 1057-1069.
 64. Seiler Mr, Rennke HG, Venkatachalam MA, Cotran RS. Pathogenesis of polycation-induced alterations (fusion) of glomerular epithelium. *Lab Invest* 1977, 36: 48-61.