TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

BÖBREK MEZANGİYUM HÜCRELERİNİN NORMAL VE DENEY KOŞULLARI ALTINDA YAPI ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Ayşe KÖSE SARGIN

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Belgin CAN

ANKARA
2009

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

BÖBREK MEZANGİYUM HÜCRELERİNİN NORMAL VE DENEY KOŞULLARI ALTINDA YAPI ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Ayşe KÖSE SARGIN

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Belgin CAN

ANKARA
2009

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan "Böbrek Mezangiyum Hücrelerinin Normal Ve Deney Koşulları Altında Yapı Özelliklerinin İncelenmesi" başlıklı, Dr. Ayşe Köse Sargın'a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Prof. Dr. Canan AKBAY
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Belgin CAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı
Üye

ÖNSÖZ

Böbrekleri etkileyen patolojik süreçlerde en çok etkilenen bölge mezangiyum olmaktadır. Bu bölgede bulunan mezangiyum hücreleri hasar süresince kritik fonksiyonlarda görev alarak mezangiyumun histolojik olarak değişimine katkıda bulunmaktadır. Böbreklerin etkilendiği hastalık durumlarında tanının konmasında veya prognozun belirlenmesinde gerek ışık gerekse elektron mikroskobik bulgular önemlidir. Günümüzde diyabetik nefropatinin varlığı öncelikle biyokimyasal testlerle mümkün olmaktadır, ancak diyabetin böbreklerde etkisi mikroskobik düzeyde daha önceden başlamaktadır. Biz bu deneysel çalışmamızda böbreklerde diyabete sekonder gelişen çoğu bilinen değişiklikleri saptadık bunun yanında sentez fonksiyonlarını değiştirerek mezangiyumun farklılaşmasına neden olan mezangiyum hücreleri üzerine elektron mikroskobik düzeyde yoğunlaştık. Kontrol ve deney grupları arasında farklılıklar gördük. Hasta prognozu açısından böbreklerdeki hasarlanmanın erken tespiti oldukça önemlidir, bu nedenle çalışmamızın ileriki yıllardaki araştırmalara ışık tutacığı ve katkıda bulunacağımızı düşünüyorum.

Uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde büyük emekleri geçen, bilgi ve birikimlerini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Canan Akbay'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında her konuda bana yardımcı olan, bilgisini, deneyimlerini benimle paylaşan her zaman arkamda olduğunu hissettiğim değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Belgin Can' a teşekkürü bir borç bilirirm.

Dört yıllık uzmanlık eğitimim sırasında destek ve anlayışlarıyla herzaman yanımda olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Yüksel Saran, Sayın Prof. Dr. Cengiz Güven, Sayın Prof. Dr. Nurşen Saraç, Sayın Prof. Dr. Alp Can, Sayın Prof. Dr. Esra Erdemli, Sayın Prof. Dr. Bizden Sabuncuoğlu, Sayın Doç. Dr. Oya Evirgen, Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz Billur'a; Uzm. Dr. Sinan Özkavukçu, Uzm. Dr. Özgür Çınar, Uzm. Dr. Serçin Karahüseyinoğlu, Uzm. Dr. Tuğba Zeyrek, Uzm. Dr. Serhan Akkuş, Dr. Ferda Topal, Dr. İpek Tanyıldızı, Dr. Hande İlkay, Dr. Sevim İnel, Bio. Deniz Balcı, Bio. Nazlı Hayırlı'ya; Nezihe Akçakaya, Hüseyin Solmaz, Erdoğan Çalışkan, Remzi Ata, Kerim Dilbaz, İlkay Bektaş'a teşekkür ederim.

Deneylerim ve gözlemlerim sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Belma Turan, Sayın Prof. Dr. Arzu Ensari ve Gülay Koç'a teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde maddi manevi desteğini esirgemeyen çok sevgili aileme; hayatıma girdiği andan itibaren hayatı benim için kolaylaştıran, hep yanımda olan çok sevgili eşim Dr. İnanç Sargın'a teşekkür ederim.

Dr. Ayşe Köse SARGIN

Ankara- 2009

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
Önsöz	II
İçindekiler	III
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	IV
Şekiller Dizini	V
Tablolar Dizini	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Böbreğin Embriyolojisi	2
2.2. Böbreğin Anatomisi	7
2.3. Böbreğin Histolojisi	8
2.4. Mezangiyum	15
2.5. Diyabetik Nefropati	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Dokuların Elde Edilmesi	24
3.2. Işık Mikroskobisi İçin Yapılan Çalışmalar	25
3.3. Konfokal Mikroskop İçin Yapılan Çalışmalar	29
3.4. Elektron Mikroskop İçin Yapılan Çalışmalar	30
4. BULGULAR	33
4.1. Kontrol ve Deney Grubunda Bulunan Sıçanların Deney Başlangıç ve Sonundaki Ağırlık ve Kan Şekerleri Değerleri İle İlgili Bulgular	33
4.2. Kontrol Grubunun Işık Mikroskobik Bulguları	34
4.3. Kontrol Grubunun Konfokal Mikroskobik Bulguları	39
4.4. Kontrol Grubunun Elektron Mikroskobik Bulguları	41
4.5. Deney Grubunun Işık Mikroskobik Bulguları	43
4.6. Deney Grubunun Konfokal Mikroskobik Bulguları	54
4.7. Deney Grubunun Elektron Mikroskobik Bulguları	55
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇLAR	78
ÖZET	80
SUMMARY	81
KAYNAKLAR	82
EKLER	95
EK 1.	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE : Angiotensin-Converting Enzyme (Anjiotensin dönüştürücü enzim)

ASMA : Alpha Smooth Muscle Actin (Düz kas aktini alfa)

Cl : Klor

DM : Diyabetes Mellitus

FITC: Fluorescein Isotiocyanate

GBM : Glomerül Bazal Membranı

GLUT-2: Glucose transporter 2 (Glikoz taşıyıcı 2)

H-E: Hematoksilen Eozin

HCl: Hidroklorik asit

IGF: Insulin-like Growth Factor (İnsülin benzeri büyüme faktörü)

LDL: Low-density lipoprotein (Düşük dansiteli lipoprotein)

M: Molar

µm: Mikrometre

MMP: Matrix Metalloproteinase

NaOH: Sodyum hidroksit

NF-kβ: Nuclear factor beta

nm: Nanometre

NO: Nitrik oksit

PAI: Plasminogen activator inhibitor

PAS: Periyodik asit Schiff

PBS: Fosfat tamponlu tuzlu su

PDGF: Platelet-derived growth factor

PGE2: Prostaglandin E2

STZ: Streptozotozin

TEM: Transmission electron microscope

TBM: Tübülüs bazal membranı

TGF-β: Transforming growth factor beta

TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VLDL: Very low-density lipoprotein (Çok düşük dansiteli lipoprotein)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.2 *Beş haftalık embriyonda gelişen üç grup böbrek yapısı. (Keith L. Moore, T.V.N. Persaud. The Developing Human Clinically Oriented Embryology'den alınmıştır).*

Şekil 2.1.3 *Metanefroz böbreğin gelişim aşamaları.(Schoenwolf G, Bleyl S, Brauer P. Larsen's Human Embryology'den alınmıştır).*

Şekil 2.3.3 *Filtrasyon diyaframının şematik görünümü. (Gartner LP, Hiatt JL, Color Text Book of Histology'den alınmıştır).*

Şekil 2.5.1 *Diyabetik nefropatide böbrek mezangiyumu ve intersitisiyel alanda sklerozisin oluşum mekanizması.*

Şekil 4.2.1 *Kontrol grubu böbrek dokusu kesiti. Düzgün sınırlı toparlak şekilli böbrek cisimcikleri (ok başı). Hematoksilen Eozin Bar:100 µm*

Şekil 4.2.2 *Kontrol grubu böbrek dokusu kesiti. Proksimal tübülüs yıldız şekilli lümeni, asidofil sitoplazması ile gözlenmekte (p). Distal tübülüs geniş lümeni ve lümeni çevreleyen çok sayıda çekirdek içeren görünümü ile izlenmekte (d) Hematoksilen Eozin Bar: 20 µm*

Şekil 4.2.3 *Kontrol grubu böbrek dokusu kesiti. Mallory-Azan Bar:100 µm*

Şekil 4.2.4 *Kontrol grubu böbrek dokusu kesiti. PAS pozitif reaksiyon veren Bowman yaprağına ait pariyetal epitel, proksimal ve distal tübülüs epitel bazal membranları (ok), proksimal tübülüs fırçamsı kenarları (ok başı), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d). Alsiyan mavisi-PAS Bar: 50 µm*

Şekil 4.2.5A-B *Kontrol grubu böbrek dokusu kesiti. Makula densa (ince ok), Bowman aralığı (BA), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d), damar lümeni (L) Gümüşleme Bar: 20 µm*

Şekil 4.2.6 *Kontrol grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Bowman aralığı (BA), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d) oil red O Bar: 50 µm*

Şekil 4.2.7 *Kontrol grubu böbrek dokusu yarı ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), podosit (po), pariyetal epitel hücresi (pe), endotel (E), eritrosit (e), Bowman aralığı (BA) Toludin mavisi-Azur II Bar: 20 µm*

Şekil 4.3.1A-B *Kontrol grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Tüplere ait bazal membranlar (ok başı), Bowman kapsülü pariyetal yaprağı bazal membranı (ok), glomerül kılcal damar bazal membranı (asteriks). Laminin Bar: 20 µm*

Şekil 4.3.2A-B *Kontrol grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Mezangiyumda ASMA' ya ait sinyal izlenmedi. B: İnterstisiyumda kas tabakası ASMA pozitif damar (ok), pozitif kontrol. ASMA Bar: 20 µm*

Şekil 4.4.1 *Kontrol grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), podosit (po), endotel (E), nötrofil (n). Uranil asetat-kurşun sitrat. Bar: 5,6 µm*

Şekil 4.4.2 *Kontrol grubu böbrek dokusu ince kesiti. Bowman kapsülü bazal laminası (bl), pariyetal epitel hücresi (pe), mezangiyum hücresi (M), podosit (po), podosit hücresine ait mitokondriyonlar (ok), endotel (E), eritrosit (e), endotel hücresine ait fenestralar (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat. Bar: 4,34 µm*

Şekil 4.4.3 *Kontrol grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresine ait sitoplazmada gözlenen yapılar: çekirdek (Ç), mitokondriyon (m), rozet yapmış ribozomlar (r), granüllü endoplazma retikulumu (GER), mikrofilamanlar (ok), komşu mezangiyum hücresinde lizozom (L). Uranil asetat-kurşun sitrat. Bar: 0,56 µm*

Şekil 4.5.1A-B *Deney grubu böbrek dokusu kesiti. A: Farklı boyutlarda böbrek cisimcikleri (ok başı), genişlemiş Bowman aralığı (BA), damar kutbu bölgesinde inflamatuvar hücreler (yıldız), perivasküler ödem (ince ok). Hematoksilen Eozin Bar: 100 µm B: Damar kutbu (dk), genişlemiş Bowman aralığı (BA), damar kutbu bölgesinde inflamatuvar hücreler (yıldız), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d). Hematoksilen Eozin Bar: 50 µm*

Şekil 4.5.2A-C *Deney grubu böbrek dokusu kesiti. A: Böbrek cisimciği (ok başı), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d), saydam sitoplazmalı tüp epitel hücreleri (asteriks). Hematoksilen Eozin Bar B: 50 µm Saydam sitoplazmalı tüp epitel hücreleri (asteriks), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d) Hematoksilen Eozin Bar: 50 µm C: Saydam sitoplazmalı tüp epitel hücreleri (asteriks), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d) Hematoksilen Eozin Bar: 50 µm*

Şekil 4.5.3A-B *Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Hipertrofik pariyetal epitel hücreleri (ok başı), saydam sitoplazmalı tübülüs epitel hücreleri (asteriks). Hematoksilen Eozin Bar: 20 µm*

Şekil 4.5.4A-F *Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Fibrozis (yıldız), tüp bazal membranlarında kalınlaşma (ok), saydam sitoplazmalı tübülüs epitel hücreleri (asteriks), interstisiyel bölgede inflamatuvar hücreler (ok başı), damar duvarında hiyalinozis (h), interstisiyel alanda ödem (iö). A-D: Masson'un trikrom boyası Bar: 50 µm E-F: Mallory-Azan Bar: 50 µm*

Şekil 4.5.5A-D *Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Böbrek cisimciği (kalın ok), tüm bazal membranlarda kalınlaşma (ok), saydam sitoplazmalı tüp epitel hücreleri (asteriks), interstisiyel bölgede inflamatuvar hücreler (ok başı), interstisiyel alanda ödem (iö), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d). Metamin gümüşleme, A: Bar: 100 µm, B-D: Bar: 50 µm*

Şekil 4.5.6A-D *Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Bazal membranlarda kalınlaşma (kalın ok), pariyetal epitel hücrelerinde hipertrofi (ok başı), Bowman aralığı (BA), nodüler glomerüloskleroz (ince ok), diffuz glomerüloskleroz (yıldız), saydam sitoplazmalı tübülüs epitel hücreleri (asteriks), Metamin gümüşleme, A-D, Bar: 20 µm*

Şekil 4.5.7A-B *Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Bowman membranında kalınlaşma (ok başı), Bowman aralığı (BA), mezangiyumda sklerotik değişiklikler (yıldız), dejeneratif değişiklikler gösteren tübülüsler (kalın ok), proksimal tübülüs fırçamsı kenarının devamlılığında bozulma (ince ok), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d). Alsiyan mavisi-PAS, A-B, Bar: 50 µm*

Şekil 4.5.7C-D *Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Bowman membranında kalınlaşma (ok başı), Bowman aralığı (BA), mezangiyumda sklerotik değişiklikler (yıldız), dejeneratif değişiklikler gösteren tübülüsler (kalın ok). Alsiyan mavisi-PAS, Bar: 20 µm*

Şekil 4.5.7E-F *Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Bowman membranında kalınlaşma (ok başı), Bowman aralığı (BA), dejeneratif değişiklikler gösteren tübülüsler (kalın ok), glomerül damar duvarında kalınlaşma (asteriks). Alsiyan mavisi-PAS, Bar: 20 µm*

Şekil 4.5.8A-B *Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Bowman aralığı (BA), mezangiyumda sklerotik değişiklikler (yıldız), dejeneratif değişiklikler gösteren tübülüsler (ok). PAS, A-B Bar: 20 µm*

Şekil 4.5.9A-B *Deney grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Kırmızı boyanan yağ damlacıkları (ok), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d). Oil red O Bar: Oil red O Bar: 50 µm*

Şekil 4.5.9C *Deney grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Kırmızı boyanan yağ damlacıkları (ok), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d). Oil red O Bar: 20 µm*

Şekil 4.5.10A *Deney grubu böbrek dokusu yarı ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), podosit (po), pariyetal epitel hücresi (pe), endotel (E), eritrosit (e), Bowman aralığı (BA). Toludin mavisi-Azur II Bar: 20 µm*

Şekil 4.5.10B *Deney grubu böbrek dokusu yarı ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), podosit (po), pariyetal epitel hücresi (pe), endotel (E), eritrosit (e), Bowman aralığı (BA), peripolar hücre (ok başı). Toludin mavisi-Azur II Bar: 20 µm*

Şekil 4.6.1 *Deney grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Bowman kapsülü pariyetal yaprağı bazal membranı (ok), glomerül kılcal damar bazal membranı (ok başı), mezangiyumda laminine ait sinyal artışı (asteriks). Laminin, Bar: 20 µm*

Şekil 4.6.2 *Deney grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Mezangiyumda ASMA pozitif alanlar (ok). ASMA, Bar: 20 µm*

Şekil 4.7.1A *Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), kılcal damar lümeni (L), podosit hücresi (po), podosit ayakçıkları (ok başı), ortak bazal lamina (kalın ok), endotel hücresi (E), endotel hücrelerine ait fenestralar (ince ok), eritrositler (e), elektron yoğun mezangiyum matriksi (asteriks). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 3,36 µm*

Şekil 4.7.1B *Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), kılcal damar lümeni (L), podosit hücresi (po), podosit ayakçıkları (ok başı), ortak bazal lamina (kalın ok), endotel hücrelerine ait fenestralar (ince ok), elektron yoğun mezangiyum matriksi (asteriks). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 2,01 µm*

Şekil 4.7.1C *Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), elektron yoğun mezangiyum matriksi (asteriks). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 2,01 µm*

Şekil 4.7.2 *Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Kılcal damar lümeni (L), podosit hücresi (po), podosit ayakçıkları (ok başı), ortak bazal lamina (kalın ok), endotel hücrelerine ait fenestralar (ince ok), mitokondriyonlar (m). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 2,01 µm*

Şekil 4.7.3 *Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresinin çekirdeği (M), eritrositler (e), podosit hücresi (po), podosit ayakçıkları (ok başı), ortak bazal lamina (kalın ok), çekirdek zarında girintiler (kıvrık ok), mitokondriyon (m). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 1,56 µm*

Şekil 4.7.4 *Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Peripolar hücresinin çekirdeği (Ç), podosit hücresi (po), sitoplazma içerisinde salgı granülleri (ok), granüllü endoplazma retikulumu (ok başı), glomerül kılcal damar lümeni (L). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 1,56 µm*

Şekil 4.7.5A *Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi çekirdeği (Ç), mitokondriyon (m), mikrofilaman içeren sitoplazma (asteriks), granüllü endoplazma retikulumu (ince ok), bazal lamina (BL), podosit ayakçıklarında birleşme (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 1,21 µm*

Şekil 4.7.5B *Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi çekirdeği (Ç), mezangiyum hücresi çekirdekciği (Çç), mitokondriyon (m), granüllü endoplazma retikulumu (ince ok), bazal lamina (BL), podosit ayakçıklarında birleşme (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 1,21 µm*

Şekil 4.7.5C *Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi çekirdeği (Ç), mitokondriyon (m), mikrofilaman içeren sitoplazma (asteriks), bazal lamina (BL), podosit ayakçıklarında birleşme (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 1,21 µm*

Şekil 4.7.5D *Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi çekirdeği (Ç), komşu mezangiyum hücre sitoplazmasında mitokondriyon (m), granüllü*

endoplazma retikulumu (ince ok), kaplı vezikül (ok başı), rozet yapmış ribozomlar (r). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 0,72 µm

Şekil 4.7.5 E *Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi çekirdeği (Ç), bazal lamina (BL), mezangiyum hücresinin bazal lamina içerisine yapmış olduğu uzantılar (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 0,56 µm*

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. *Kontrol ve deney grubunun deney başlangıç ve sonundaki ağırlık ve kan şekeri düzeyleri.*

Tablo 4.1.1. *Konrol ve deney grubuna ait deney başlangıç ve sonundaki ağırlık ve kan şekerinin Mann Whitney U testine göre istatistiksel sonuçları.*

1. GİRİŞ

Son 20 yıldır böbrek mezangiyum hücrelerinin fenotiplerini ve fonksiyonlarını değiştirerek çeşitli uyarılara ya da zararlı ajanlara cevap verme yetenekleri olduğu bilinmektedir. Mezangiyum bölgesi işlevsel ve yapısal olarak glomerülün merkezini oluşturduğundan, glomerülleri ilgilendiren birçok hastalığın başlangıç aşamasında ilk etkilenen hedef bölge olarak hasar görmektedir. Mezangiyum hücreleri hasara cevap olarak genellikle çok hızla prolifere olurlar. Hasar yapıcı ajanların sorumlu olduğu, mezangiyum hücrelerinin fenotipik değişimlerine neden olan spesifik mekanizmaların belirlenmesi oldukça önemlidir. Mezangiyum hücrelerinde ekstrasellüler matriks üretiminden ve yıkımından sorumlu sinyal yolaklarının işleyişindeki moleküler temelin ve mezangiyum hücrelerinde, mezangiyum mikro çevresinde meydana gelen değişiklikler sırasında homeostazı korumak için sitoplazmalarında olan değişikliklerin anlaşılması çok sayıda glomerül hastalığının progresyonunun değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmada, deney modeli olarak diyabet oluşturulan sıçanların böbrek dokuları, ışık, konfokal ve elektronmikroskobunda incelenip değerlendirilmiştir. Glomerüllerde oluşan hasar sonucunda, mezangiyum hücrelerinin sergiledikleri yapısal değişikliklerin histolojik yöntemlerle gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreğin Embriyolojisi

Ürogenital sistem, embriyonun dorsal vücut duvarı boyunca yerleşen, ara mezodermden gelişir. Embriyonun horizontal planda katlanması sırasında bu ara mezoderm ventrale doğru çekilir ve somitlerle olan bağlantısını kaybeder. Böylece dorsal aortun her iki yanında ürogenital kabartı adı verilen longitudinal bir mezoderm kabartısı oluşur. Bu doku daha sonra üriner ve genital sistemleri oluşturacaktır. Üriner sistemi oluşturacak olan ürogenital kabartı kısmı nefrojenik kordon veya kabartı adını alırken genital sistemi oluşturacak kısım genital kabartı olarak adlandırılır (1).

Üriner sistem, genital sistemden daha önce gelişmeye başlar. Üriner sistem; idrar oluşturan böbrekler, idrarı böbreklerden mesaneye ileten üreterler, idrarı geçici olarak depo eden mesane ve idrarı mesaneden dış ortama ileten üretradan oluşmuştur (1).

Deneysel olarak böbrek gelişimi paraksiyal mezodermden kalkan sinyallerle başlar. Bu sinyallere cevap ara mezodermden Lim-1 ve Pax-2 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonudur. Lim-1; primer nefrik kanalı yapmak üzere ara mezoderm hücrelerinin kümelenmesini, Pax-2 ise ara mezoderm hücrelerini epitelyal nefrik tübülüsleri yapması yönünde uyarmaktadır (2).

İlk olarak oluşan böbrek sistemi olan pronefrozlar rudimenterdir ve fonksiyonel bir özelliğe sahip değildir. Bu böbrek sistemi primitif balıklardaki böbreklere anologdur. İkinci oluşan böbrek sistemi mezonefrozlar daha iyi gelişmiş haldedir, kısa bir süre fonksiyon da görür, bu böbrek sistemi kurbağagillerdeki böbreklere anologdur. Üçüncü olarak oluşan böbrek sistemi metanefrozlar, kalıcı, esas böbrekleri oluşturan sistemdir (3).

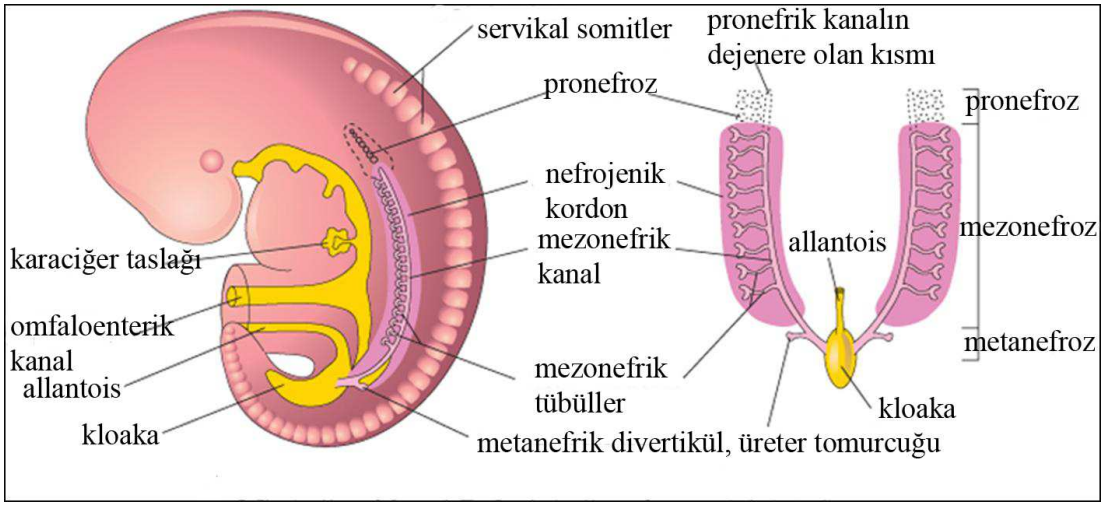
2.1.1 Pronefroz

Pronefrozlar fonksiyonel olmayan yapılardır, insan embriyonunda ilk olarak 4. haftanın başlangıcında ortaya çıkarlar. Pronefrozlar embriyonun boyun bölgesinde az sayıda hücre kümesi ve kıvrılmış tübüler yapılar olarak temsil edilirler (4). Pronefrik duktus kaudal olarak uzanır ve kloakaya açılır. Rudimenter olan pronefrozlara ait

yapılar, kısa süre içinde dejenerasyona uğrarlar ancak pronefrik duktusların çoğunluğu belirli süre kalır ve bir sonraki böbrek sisteminde bunlardan yararlanılır (1).

2.1.2. Mezonefroz

Oldukça genişlemiş ve uzamış boşaltıcı organlar olan mezonefrozlar, dördüncü haftanın sonuna doğru rudimenter yapılar olan pronefrozların kaudalinde ortaya çıkarlar. Bu yapılar daha iyi gelişmiştir ve kalıcı böbrekler oluşuncaya kadar ara böbrekler olarak embriyonda fonksiyon görürler. Mezonefrik böbrekler glomerüller ve mezonefrik tübüllerden oluşmuşlardır. Mezonefrik tübüller pronefrik duktustan köken alan mezonefrik duktusa açılırlar. Mezonefrik duktus da kloakaya açılır. Mezonefrozlar birinci trimesterin sonuna doğru dejenere olur; ancak mezonefrik tübüller erkeklerde testisin duktuli efferenteslerine ve mezonefrik duktusa dönüşürler. Mezonefrik duktus yetişkin erkek bireylerde önemli yapılara dönüşmektedir (1).



Şekil 2.1.2. Beş haftalık embriyonda gelişen üç grup böbrek yapısı.
(Keith L. Moore, T.V.N. Persaud. The Developing Human Clinically Oriented Embryology'den alınmıştır).

Kraniyokaudal yönde üst torakal ile 3. lumbal vertebra arasında 40 çift mezonefrik tübül gelişir. Kaudal tübüller ileri farklanırken kraniyal tübüller regrese olurlar. Bu yüzden hiçbir zaman 30 çiftten daha fazla mezonefroza rastlanmaz. 5.

haftanın sonunda kraniyal bölgedeki mezonefrozlar aşırı derecede regresyona uğrarlar. İlk 3 lumbal vertebra hizasında 20 çift tüp kalır ve bunlar boşaltım birimlerine farklanırlar (5).

2.1.3. Metanefroz

Metanefrozlar veya kalıcı böbrekler beşinci haftanın başında gelişimine başlarlar ve yaklaşık 4 hafta sonra da fonksiyonel hale gelirler (1).

İdrar oluşumu fötal yaşam boyunca devam eder. Oluşan idrar amniyon boşluğuna verilir ve burada amniyon sıvısı ile karışır. Olgun bir fötus günde birkaç yüz mililitre amniyon sıvısı yutar ve bu sıvı bağırsaklardan emilir. Yıkım ürünleri atılmak amacıyla plasenta yoluyla anne kanına transfer edilir. Kalıcı böbrekler iki farklı kökene sahiptir. Bunlardan birincisi; metanefrik divertikül (Üreter tomurcuğu) diğeri ise intermediyer mezodermin metanefrik kitlesidir (Metanefrojenik blastem) (1).

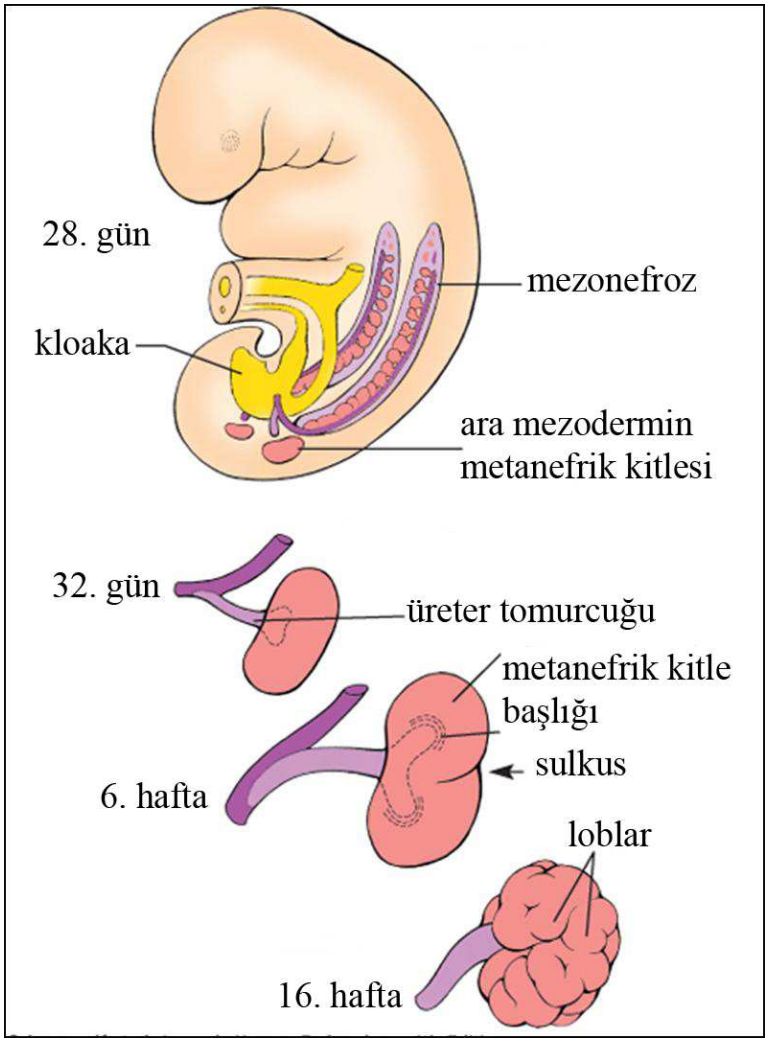
Üreter tomurcuğu, mezonefroz borusunun kloakaya giriş yerine yakın, dışa doğru yapmış olduğu bir divertiküldür. Metanefrik mezoderm ise, nefrojenik kordonun kaudal kısmından köken almaktadır. Metanefrozun her iki primordiyal bölümü de mezodermal kökenlidir (4).

Metanefrik divertikül veya üreter tomurcuğu; üreter, renal pelvis, kaliksler ve toplayıcı kanalların primordiyumudur (ilkel şekilleridir). Metanefrik mezoderme doğru uzayarak içerisine penetre olur. Genişleyen uç kısmı üzerindeki intermediyer mezodermin metanenefrik kitlesinin oluşumunu uyarır. Metanefrik mezoderm ve üreter tomurcuğu arasındaki indüktif ilişkide hücre yüzeyindeki N-bağlı oligosakkaritlerin önemli olduğu düşünülmektedir. Yine mezanşimin epitele dönüşümünde sindekan ve E-kaderin gerekli moleküllerdir (4).

Metanefrik divertikülün sap kısmı üretere farklanır ve genişleyen kraniyal kısmı renal pelvisi oluşturur. Düz toplayıcı tübüller, tekrar tekrar dallanarak toplayıcı tüplerin bütün tiplerini meydana getirirler. İlk 4 toplayıcı tübül jenerasyonları birleşerek major kaliksleri oluştururlar. İkinci oluşan dört jenerasyon birleşir ve minör kaliksleri oluşturur. Her bir toplayıcı tübülün ark oluşturan son kısmı metanefrik mezoderm içindeki mezanşimal hücre kümelerini uyararak, küçük metanefrik veziküllerin oluşumuna neden olurlar. Bu veziküller uzarlar ve

metanefrik tübülleri oluştururlar. Böbrek tübülleri bu şekilde gelişirken onların proksimal uçlarında glomerüller gelişir (1).

Böbrek cisimciği, proksimal tübülüs, henle kulpu ve distal tübülüs hep beraber nefronu yaparlar. Her bir distal kıvrıntılı tübül ark oluşturan bir toplayıcı tübül ile bağlantı kurar ve sonuçta tübüller birleşirler. Gebeliğin 10-18. haftaları arasında glomerüllerin sayıları yavaş yavaş artar ve 32. haftada sayıca en yüksek değere ulaşır (1).



Şekil 2.1.3 Metanefroz böbreğin gelişim aşamaları. (Larsen’s Human Embryology’den alınmıştır).

Doku kültürü çalışmaları üreter tomurcuğunun dallanmasının metanefrik mezoderm indüksiyonuna bağlı olduğunu nefronların gelişiminin ise toplayıcı tübüllerin uyarısını gerektirdiğini göstermiştir. Üriniferöz tübül embriyolojik olarak iki farklı kökene sahiptir; Nefron metanefrik mezodermden, toplayıcı tübüller ise üreter tomurcuğundan gelişmektedir (4).

Fötal böbrekler dıştan da görülebilen loblara ayrılmışlardır. Lobülasyon fötal periyodun sonuna doğru azalır ancak yenidoğan bir infantta böbrek lobları hala ayırdedilmeye devam eder. İnfantların büyümesi sırasında, böbreklerde nefronların artması ve büyümeleri sonucu lobülasyon kaybolur. Böbreklerin loblu karekterleri yetişkinlerde görülmez, bununla birlikte bazı hayvan türlerinde olduğu gibi (örn: sığırlar), yetişkin insanlarda da çok nadir olarak böbrek lobları dıştan seçilebilir (4).

Gebeliğin sonunda, gelişmiş her bir böbrekte 800.000 ile 1.000.000 adet nefron bulunmaktadır. Doğumdan sonra böbreklerde özellikle interstisiyel doku artışı ve proksimal kıvrıntılı tübüllerin uzaması sonucu hacim iyice artar. Doğum zamanında prematür infantlar hariç, nefron oluşumunun tamamlandığına inanılmaktadır. Böbreklerin fonksiyonel olgunlaşması doğumdan sonra gerçekleşmektedir. Glomerüler filtrasyon fötal yaşamın 9. haftasında başlar ve doğumdan sonra filtrasyon oranında artış görülmektedir (5).

Başlangıçta kalıcı böbrekler sakrumun ventralinde birbirlerine yakın halde pelvis içerisinde yerleşmişlerdir. Karın ve pelvis büyümesi ile beraber böbrekler yavaş yavaş karın içerisine yerleşirler ve yukarı doğru hareket ederler. 9. haftada yetişkindeki pozisyonlarına ulaşırlar. Böbreklerin bu rölatif yükselişi embriyonun kaudal vücut kısmının böbreklere doğru büyümesinden kaynaklanmaktadır. Kaudal vücut kısmının bu seviyelerde büyümesi sonucu böbrekler aşamalı olarak daha yukarı bölgelere yerleşirler. Böbrekler sonunda karın arka duvarında retroperitoneal bölgeye geçerler (1).

Başlangıçta böbreklere damarların ve sinirlerin girip çıktığı yer olan hilus bölgesi ventrale bakmaktadır ancak böbreklerin yükselmesiyle birlikte hilus medial hatta doğru 90 derecelik bir dönüş yapar. 9. haftayla birlikte hilus anteromedial hatta yönelmiştir. Pelvis içerisinde yerleşen böbrekler kanlanmasını bölgedeki yakın kan damarlarından temin ederler. Başlangıçta, renal arterler A. iliaka communisten dallanır. Böbrekler yükseldiğinde kan beslenmesi aortun distal ucundan sağlanırken;

daha üst seviyeye ulaştıklarında aortun yeni dallarından kan alırlar. Normal olarak kaudalde bulunan dallar involüsyona uğrarlar ve kaybolurlar. 9. haftada böbrekler sürrenal bezlere kadar ulaştıklarında yükselmeleri durmaktadır. Böbrekler en üst arter dallarını abdominal aortadan alır ve bu dallar kalıcı böbrek arterlerini oluştururlar. Sağ renal arter, soldakinden daha uzundur ve daha yukarıdadır (1).

2.2. Böbreğin Anatomisi

Böbrekler bel bölgesinde, omurganın iki tarafında 12. torakal vertebra ile 3. lumbal vertebra arasında karın arka duvarında bulunan bir çift organdır (6). İnsan böbreği 10-12 cm uzunluğunda 5-6 cm genişliğindedir. Üreter, venler ve lenf damarlarının çıktığı; arterler ve sinirlerin girdiği iç kenarın orta kısmı çukurdur ve burası hilus adını alır (7).

Böbrekler vücutta en çok kanlanan organlardan biridir. Aortadan ayrılan renal arter hilus hizasında anterior ve posterior segment dallarına ayrılır. Segment arterleri ise interlobar arterlere dallanır. İnterlobar arterler korteks medulla sınırında arkuat arterleri oluştururlar. Arkuat arterler; interlobüler arterleri onlar da afferent arteriyolü oluştururlar. Afferent arteriyol glomerül kılcal damar ağını oluşturur ve glomerülü efferent arteriyol olarak terk eder. Efferent arteriyol korteksde peritübüler kılcal damar ağına dallanır. Daha sonra kan kılcal damarlardan sırasıyla interlobüler, arkuat, interlobar venlere drene olur. En sonunda renal vene drene olan kan böbrekleri terk eder (8). Böbrekler renal pleksusdan ayrılan otonom sinirler tarafından innerve edilir (9).

Hilustan içe doğru böbreğin orta kısmında, böbrek parankimi ile kuşatılmış yassı bir boşluk vardır. Bu boşluğa sinus renalis denir. Sinus renalisde yağ dokusu içerisinde damarlar, sinirler, üreterin böbrek boşluğu içinde yaptığı genişlemeyle oluşan böbrek pelvisi ve kaliksler bulunur. Kaliksler böbrek pelvisinin dallanmasıyla oluşur. Pelvis önce büyük kaliks denen 3-4 ana dala onlarda küçük kaliks denen 8-20 birime ayrılır. Her bir minor kaliks böbrek papillası denen medulla piramitlerinin uç kısmını silindir şeklinde sarar. Böbrek uzunlamasına ortadan kesilip iki eşit kısma ayrıldığında çıplak gözle iki farklı yapı gözlenir. Korteks ve medulla olarak isimlendirilir. Korteks dış, medulla ise iç kısımda bulunur (6).

Medullada 8-20 adet medulla piramitleri denen koni şeklindeki yapılar bulunur. Medulla piramitlerinin kesit yüzeyleri üçgen şeklindedir, piramitlerin tepeleri papilla denen yapıları oluşturarak küçük kaliksler içine sokulur. Medulla piramitleri korteks dokusunun medullaya yaptığı uzantılarla birbirinden ayrılmıştır. Piramitler arasındaki bu korteks dokusuna böbrek kolonları veya Bertini kolonları adı verilir. Bir medulla piramidi onu çevreleyen sıkıca ilişkili olduğu korteks dokusuyla birlikte bir böbrek lobunu oluştururken bir medulla uzantısı ilişkili olduğu korteks dokusuyla birlikte bir böbrek lobcuğunu yapar. İnsan böbreği çok lobludur. Bazı türlerde sıçan, tavşan gibi hayvanların böbreği tek lobludur. Yani tek bir medulla piramidi bulundururlar (7).

2.3. Böbreğin Histolojisi

Böbrekler; kılcal damarlardan kan süzerek oluşturdukları idrar ile kandan zararlı metabolizma ürünlerini uzaklaştıran idrarın yoğunluk ve yapısını değiştirmek suretiyle de organizmanın su ve elektrolit metabolizmasını asit-baz dengesini ayarlayan birleşik tübüler yapıda bezlerdir. İdrar tüpçükleri (ürineferoz tübül) denen bu tüpçükler böbreğin parankimasını oluşturur. İdrar tüpçükleri idrarı oluşturan nefronlar ve nefronun yaptığı idrarı pelvise taşıyan toplayıcı kanallar olmak üzere iki kısımda incelenir (10).

Nefron böbreğin yapı ve görev birimidir. Her bir insan böbreğinde 1 ile 2 milyon arasında nefron bulunmaktadır. Tek katlı epitelden yapılı olan ve beş bölümde incelenen bu tüpçükler glomerül adı verilen kılcal damar yumağını saran toparlak şekilli bir genişlemeyle kör olarak başlar. Bowman kapsülü denen çift yapraklı zar bu glomerülü çevreleyerek birlikte nefronun birinci parçası böbrek (Malpighi) cisimciğini yapar. Böbrek cisimcikleri çıplak gözle görülebilen 150- 250 µm çapta düzensiz küre şeklinde yapılardır. Böbrek cisimciğinin büyüklüğü ve nefronun diğer segmentlerinin uzunluğu ilgili böbrek cisimciğinin korteksdeki yerleşim yerine bağlı olarak farklılık gösterir. Medullaya yakın böbrek cisimcikleri daha büyüktür ve diğer kısımları gibi ince parça da oldukça uzundur, hemen hemen böbrek papillasının tepesine kadar uzanır. Kapsül altındaki cisimcikler küçüktür ve bu nefronların ince parçası da çok kısadır ve bazılarında yoktur. Böbrek cisimciği korteksin orta kısmında olan nefronlar orta büyüklüktedir (7).

Nefronun ikinci parçası proksimal tübülüs adını alır; kıvrıntılı (pars konkorta) ve düz (pars rekta) bölgeleri vardır. Nefronun üçüncü bölgesi ince (ara) parçasıdır. Nefronun distal tübülüs olarak adlandırılan dördüncü parçasının da kıvrıntılı, makula densa ve düz bölümleri vardır. Proksimal tüpçüğün düz inen parçası, ince parça ve distal tübülüsün düz çıkan parçası birlikte Henle kulpu olarak adlandırılır. Beşinci ve son kısım olan bağlayıcı tüpçük toplama borularıyla bağlantıyı sağlar. Böbrek cisimciği ile proksimal ve distal tübülüslerin kıvrıntılı kısımları sadece kortekste bulunur. Henle kulpu ise medullada ve medulla uzantılarında bulunur (10).

2.3.1. Glomerül

Glomerül toparlak yapıda bir kılcal damar yumağıdır. Böbrek cisimciğine gelen afferent arteriyol cisimciğe girer girmez dört veya daha fazla dala ayrılır. Bu dalların her biri bir lobçuk yapmak üzere kılcal damar ağını oluştururlar. Lopçuk, bir sapa veya mezangiyum bölgesi denilen destekleyici bir kısma sahiptir. Lopçuk kılcalları efferent arteriyolu oluşturmak üzere yeniden birleşirler. Glomerül kılcalları endoteli iyice ince tek katlı yassı epitelden ibarettir. Her bir endotel hücresi fazla sayıda, 50-100 nm çaplarında pencerelere (fenestra) sahiptir. Çoğu pencereli endoteldekinin aksine glomerül endotel hücrelerinin pencerelerinde diyafram bulunmaz (7).

2.3.2. *Bowman Kapsülü*

Bowman kapsülünün dış (pariyetal) yaprağı gelen ve giden (efferent) arteriyolün girip çıktığı damar kutbunda glomerül üzerinde dönerek kılcal damarları sıkıca kuşatır; bu iç zar Bowman kapsülünün iç (visseral) yaprağını oluşturur. Pariyetal ve visseral yaprak arasında Bowman aralığı denen dar bir aralık kalır. Damar kutbunun zıt tarafında Bowman kapsülün dış yaprağı proksimal kıvrıntılı tübülüsün lümeni ile devam eder. Glomerülün bu tarafına idrar kutbu denilmektedir. Süzülerek kapsül aralığında biriken ultrafiltrat bu yolla proksimal kıvrıntılı tübülüse geçer (11).

Bowman kapsülünün dış yaprağı tek katlı yassı çok yüzlü hücrelerden oluşmaktadır. Bu epitel dış tarafta ince bir bazal lamina üzerine oturur. Sıkıca birbirine tutunan hücreler az miktarda organel içerir. Tek katlı yassı epitel idrar kutbunda birden proksimal kıvrıntılı tübülüsün kübik epiteline dönüşür. Bowman kapsülünün visseral yaprağını oluşturan yassı hücrelerin ayakçıkları vardır; bu

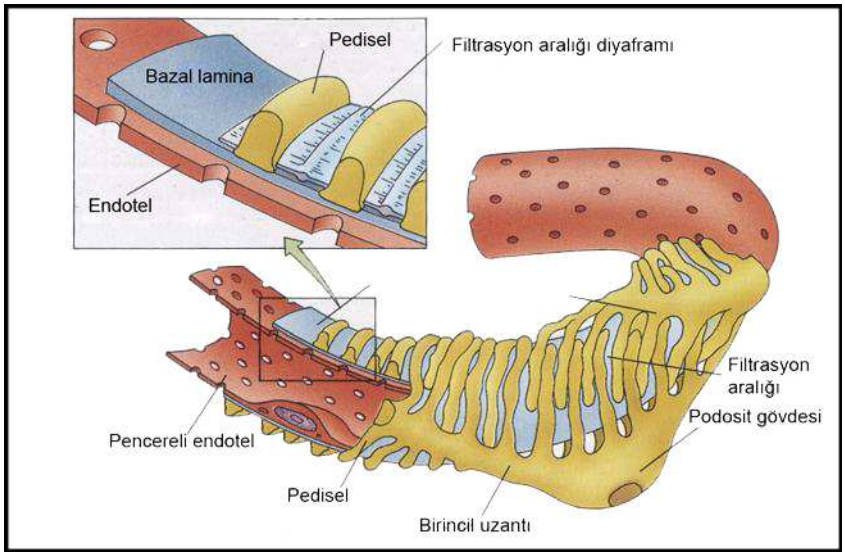
hücrelere podosit denir ve kılcal damarların dış yüzünü kesintisiz sararlar. Çekirdekleri irice ve girintili çıkıntılıdır. Sitoplazmalarında mitokondriyonlar, serbest ribozomlar ve iyi gelişmiş Golgi kompleksi, hem çekirdek çevresinde hem de birinci ve ikinci dallanmalar içerisinde pek çok mikrotübülüs ve mikrofilamanlar bulunur. Sitoplazma uzantıları kısa bir seyirden sonra ikinci ve üçüncü dallanmalar yapar. Pedisel denen son uzantılar komşu podositlerin benzer uzantılarıyla birbiri arasına girerek bazal lamina üzerinde aralarında dar bir aralık bırakarak kenetlenirler. Pediseller arasındaki 25 nm kadar genişlikte olan açıklıklara filtrasyon aralığı denir. Pedisellerin fazla sayıda aktin içermesi filtrasyon aralığının genişliğinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Podositlerin ve uzantılarının yüzeyi podokaliksin denen siyaloprotein yapısında glikokaliksle kaplıdır. Podokaliksin filtrasyon aralığını daraltıp hem fiziksel olarak hem de negatif yüküne bağlı olarak süzülmede önemli rol oynar. Filtrasyon aralığında filtrasyon diyaframı denilen gözenekli bir diyafram bulunur (7).

Podositlerin ayakçıkları ve kılcal damar endoteli arasında 310-350 nm kalınlıkta normal bazal laminadan daha kalın olan kesintisiz bir bazal lamina bulunur. Bazal lamina tip IV kollajen, laminin ve fibronektin içeren, heparan sülfattan zengin glikozaminoglikan yapısında esas maddeden ibarettir. Elektron mikroskobunda ortada koyu (lamina densa) ve iki tarafta açık (endotel tarafı lamina rara interna, podosit tarafı lamina rara eksterna) olarak görülür (10).

Filtrasyon Bariyeri

Filtrasyon bariyerini; pencereli glomerül endoteli, ortak bazal lamina ve podositlerin ayakçıkları oluşturmaktadır. Bu bariyer su ve iyonların geçmesine izin verirken hücrelerin ve büyük protein moleküllerin geçişini engeller (7).

Bariyerin etkinliği özellikle bazal membranın ve podosit uzantılarının negatif yüküne bağlıdır. Bazı böbrek hastalıkları bu yük kaybından dolayı oluşmaktadır; bu durumda bariyerden bol miktarda protein geçişi söz konusudur (11).



Şekil 2.3.3 Filtrasyon diyaframının şematik görünümü. (*Gartner LP, Hiatt JL, Color Text Book of Histology'den alınmıştır)*

2.3.3. *Proksimal Tübülüs*

Proksimal tübülüs böbrek cisimciğinin idrar kutbundan başlar. Memeli nefronunun en uzun bölümüdür, korteksin çoğunluğunu proksimal tübülüsler oluşturur. Proksimal tübülüs iki kısma ayrılır; birinci bölüm kıvrıntılı parça böbrek cisimciğinin idrar kutbundan başlayan ilk bölümdür, korteksde yer alır. İkinci bölüm ise düz parçadır; kıvrıntılı parçanın devamı olup medullada seyreder. Kıvrıntılı parça düz parçadan daha uzundur. Proksimal tübülüs korteks içerisinde çıktığı böbrek cismi çevresinde kıvrıntılı bir seyir yaptıktan sonra korteks içerisinde daha düzgünce bir yol alarak medullaya veya medulla çizgilerine girer. Proksimal tübülüsün düz kısmı Henle kulpunun ilk kısmını oluşturmak üzere böbrek papillası yönünde seyreder (7).

Proksimal kıvrıntılı tübülüs iyi gelişmiş fırçamsı kenarlı, büyük, tek katlı piramit şekilli hücrelerle çevrelenmiştir. Fırçamsı kenarı oluşturan mikrovillusların yüzeyini hücre dışı bir mukopolisakkarit tabakası örter. Hücrelerin yan yüzleri birbiri arasına giren uzantılara sahiptir. Bazal hücre zarı da hücre içerisine birçok katlantılar yaparak girintili çıkıntılı bir labirent sistemi oluşturur. Böylece daha geniş bir yüzey meydana gelerek iyon geçişi kolaylaştırılır. Proksimal tübülüs hücreleri yuvarlak merkezde yerleşmiş bir çekirdeğe, belirgin çekirdekçiğe, supranükleer bir Golgi

kompleksine ve çok sayıda bazal mitokondriyona sahiptir. Çubuk şeklinde olan mitokondriyonlar hücrenin uzun eksenine paraleldir ve bazal hücre katlantılarıyla sıkıca ilişkilidir. İyon geçişi için harcanan enerji bu mitokondriyonlar tarafından sağlanır (14).

Proksimal tübülüsün düz kısmı medulla çizgilerinden başlar, medulla içinde seyreder. Düz kısım medullanın dış zonunun dış sınırında sonlanarak ince parçayla devam eder. Proksimal tübülüsün kıvrıntılı ve düz kısmı yapı olarak birbirlerine benzer fakat düz kısımdaki hücreler daha kısadır ve fırçamsı kenar kıvrıntılı kısımdakinden daha az gelişmiştir (7).

2.3.4. İnce Parça

Proksimal tübülüsün inen düz kısmından sonra gelen bölümdür. Proksimal tübülüsün tek katlı kübik epiteli birden ince parçanın tek katlı yassı epiteline değişir. Lümen çapı da proksimal tübülüsün inen parçasında 65 µm iken ince parçada yaklaşık 20 µm'ye iner. Nefronların ince parçaları böbreğin medulla kısmında yer alır. İnce parçayı döşeyen epitel hücrelerinin çekirdeği hücrelerin merkezindedir ve hücrenin bu kısmının lümene doğru çıkıntı yapmasına neden olur. İnce yapı düzeyinde sitoplazma az organel içerir. Hücreler yüzeye yakın olarak tipik bağlantı kompleksleriyle birbirine tutunmuştur (12).

2.3.5. Distal Tübülüs

Distal tübülüs düzgün seyreden bir kısım pars rekta, makula densa ve kıvrıntılı seyreden pars konkorta olmak üzere üç kısıma ayrılır. Distal tübülüsün düz kısmı iç ve dış medulla sınırı yakınında nefronun ince parçasından başlar. Epitelin yüksekliği kübiğe doğru artar. Proksimal tübülüsdeki fırçamsı kenar görülmez, birkaç mikrovillus vardır. Hücrelerin yan yüzlerinde girinti çıkıntılar vardır ve bu bölgede bol mitokondriyon bulunur. Distal tübülüsün düz kısmı Henle kulpunun kalın çıkan kolunu da oluşturur ve kortekse doğru ilerleyerek kendi böbrek cisimciğine geri dönmek üzere kortekse girer. Kortekse giren distal tübülüs böbrek cisimciğine ulaşarak damar kutbunda gelen arteriyol ile yakın ilişki kurar. Arteriyole gelen tübül kısmı makula densayı oluşturan özelleşmiş bir grup hücre içerir. Makula densayı oluşturan hücreler tübülüsün normal hücrelerinden daha prizmatiktir. Bu bölgeye

makula densa denilmesinin sebebi çekirdeklerin daha sıkı oluşundan dolayı yoğun görüntüdür. Makula densa hücreleri bazal yüzeye doğru kutuplaşır. Makula densa gelen arteriyolün modifiye bir kısmı olan ve böbreğin endokrin kısmı kabul edilen jukstaglomerül hücreleriyle ilişkilidir (7).

Makula densanın devamı distal kıvrıntılı tübülüsdür. Bunlar proksimal kıvrıntılı tübülüslerden daha kısadır, bu nedenle histoloji preparasyonlarında daha az distal tübülüs kesiti gözlenir (10).

2.3.6. Henle Kulpu

Proksimal ve distal kıvrıntılı tübülüsler arasındaki kısımdır. Proksimal tübülüsün düz kısmı, ince parça ve distal tübülüsün düz parçasından ibarettir. Henle kulpu medullada farklı mesafelere iner ve U şeklinde dönüş yaparak inen kola paralel bir şekilde kortekse doğru çıkar. Henle kulpu idrarın hipertonikleştirildiği başlıca yerdir. Böylece vücut suyunun korunması sağlanır (7).

2.3.7. *Bağlayıcı Parça*

Nefronun son bölümü olup distal tübülüsü toplayıcı kanallara bağlayan çok kısa bir parçadır. Böbrek lopçuklarının kenarlarında yer alır. Epiteli distal tübülüs ve toplama borucukları epitelinin karışımıdır (10).

2.3.8. Toplama Borucukları

Toplama borucukları; korteks toplama boruları, dış medulla bölgesi toplama boruları, iç medulla bölgesi toplama boruları gibi bulundukları yere göre bölümlere ayrılabilirler. Korteks toplayıcı kanalları medulla çizgilerine ulaşır. Borucuğu döşeyen hücreler kübik olup iyi belirlenen sınırları, soluk boyanan sitoplazmaları, merkezde yerleşmiş toparlak çekirdekleri vardır. Borucuklarda esas hücreler denen hücrelerden başka, bunların arasına serpilmiş olarak görülen, koyu sitoplazmalı ikinci bir hücre tipi daha vardır. Koyu hücrelerin yüzeyi sıklıkla mikroplika denen katlantılarla kaplıdır. İç medulla toplama borucukları birleşerek papilla boruları denen büyük, düz toplama borularını oluşturmak üzere bir araya gelirler. Papilla boruları böbrek papillasının tepesinde sonlanır. İnsanda toplama borucuklarının bazal membranları papillaya yaklaştıkça artar. Bu görünüm yaş ilerledikçe daha

belirginleşir. Papilla yüzeyinde bu boruların açıldığı küçük delikçikler görülür. Fazla sayıdaki delikçik papilla yüzeyine elek görünümü verdiği için buraya area cribroza denir. Papillanın dış yüzü değişici epitel ile kaplıdır (10).

2.3.9. İnterstisiyum

Böbrek ara dokusu tübülüslerin arasındaki yerleri doldurur. Korteksde interstisiyum kan ve lenf damarlarından oluşmaktadır. Medulla bölgesinde ise interstisiyum matriks proteinlerini özellikle kollajen lifleri ve glikozaminoglikanları içermektedir (11).

2.3.10. Jukstaglomerüler Kompleks

Jukstaglomerüler kompleks glomerülün damar kutbuna yerleşmiştir; Makula densa, ekstraglomerüler mezangiyum hücreleri, jukstaglomerül hücreleri ve peripolar hücrelerden oluşmaktadır. Makula densa; distal tübülüsün terminal-kıvrıntılı kısmının başlangıç bölümündeki özelleşmiş hücrelerden oluşur. Bu hücrelerin, distal tübülüs hücrelerine göre daha uzun ve daha sık yerleşim gösteren çekirdekleri vardır. Golgi kompleksleri çekirdek altında yoğunlaşmıştır. Makula densa hücreleri lümende, ultrafiltrattaki Na ve Cl konsantrasyonunu algılayarak renin salınımını düzenler. Bu süreçte NO, fosfolipaz A2 ve PG E2'nin önemli aracılardan olduğu düşünülmektedir. Lümende Na konsantrasyonunun azalması renin salınımını azaltmaktadır (13).

Jukstaglomerül hücreleri; makula densaya komşu afferent arteriyolün kas katında bulunurlar. Bol granüllü endoplazma retikulumu, Golgi kompleksi ve PAS(+) reaksiyon veren toparlak salgı granülleri bulunur. Bu hücreler renin salgılarlar. Reninin görevi Anjiyotensinojenden Anjiyotensin I oluşumunu sağlamaktır. Akciğerlerden salgılanan dönüştürücü enzim ise Anjiyotensin I'i Anjiyotensin II' ye çevirir. Anjiyotensin II, aldosteron salınımını uyarır. Aldosteron ise distal tübülüse etki ederek lümendeki Na iyonunun içerdeki K iyonuyla değişmek üzere geçişini sağlar. Anjiyotensin II damar daraltıcı etki de ederek kan basıncını yükseltir. Bazı türlerde eritropoetin de üretir. Bazı araştırıcılara göre eritropoetin peritübüler kılcal damar endotelinden salgılanmaktadır (13).

Ekstraglomerüler mezangiyum hücrelerinin, (Lacis hücreleri, Goormaghtigh hücreleri); afferent, efferent arteriyol hücreleri ve intraglomerüler mezangiyum hücreleriyle çok sayıda gap junction tipi bağlantıları olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin makula densa hücreleriyle yakın ilişkide oldukları ve jukstaglomerüler kompleks içerisinde bağlantı sağlayıcı hücreler olarak görev gördükleri düşünülmektedir (10).

Peripolar hücreler ilk kez Ryan ve Gall tarafından, Bowman boşluğunda, damar kutbunda glomerül yumağının başlangıcındaki yerleşimleriyle tanımlanmıştır. Podositlerle, pariyetal yapraktaki yassı epitel hücreleri arasında bulunurlar. Pariyetal epitel hücrelerinin bazal membranı üzerine otururlar, apikal yüzleri Bowman (idrar) boşluğuna bakar. Jukstaglomerüler kompleksin bir parçası oldukları düşünülmektedir. İnsanda kortikal nefronlarda daha sık rastlanır. Peripolar hücreler elektron mikroskobunda koyu renkte gözlenen çok sayıda salgı granülü içerir. Bu hücrelerin Bowman boşluğuna salgıladıkları maddelerle tübülüslerdeki salgılama ve geri emilim işlevlerinde etkili oldukları düşünülmektedir (14).

Jukstaglomerüler kompleks, renal kan akışı ve glomerüler filtrasyonun otoregülasyonu ile ilgili tübüloglomerüler geri besleme mekanizmasının bileşenlerinden biridir. Diğer bileşen ise, jukstaglomerül hücrelerini uyaran sempatik sinir lifleridir. Renin salınımı, adrenerjik sinir liflerinden salınan norepinefrin ve dopaminle artırılır. Norepinefrin, afferent glomerüler arteriyoldeki α1-adrenerjik reseptörlere vasokonstrüksiyon oluşturmak için bağlanır. Parasempatik innervasyon hiç yoktur (12).

2.4. Mezangiyum

Mezangiyum, glomerül kılcal damarları arasında bulunan mezangiyum hücreleri ve mezangiyum matriksinden oluşur. Ayrıca, mezangiyum hücreleri, makula densa ile afferent ve efferent glomerül arteriyolleri ile sınırlandırılan bir boşlukta, glomerül dışında da toplanırlar buradaki hücrelere; ekstraglomerüler mezangiyum hücreleri (Lacis hücreleri veya Goormaghtigh hücreleri) denmektedir.

Mezangiyum glomerülün fonksiyonel ve yapısal çekirdeği olarak görülür, bu özelliğinden dolayı glomerülleri tutan hastalıklarda hasarlanan önemli bir alan haline dönüşür. Mezangiyum hücreleri yaklaşık olarak toplam glomerül hücre

populasyonunun % 30-40’ ını oluşturmaktadır, bu hücreler glomerülün hilusundan ağaçsıl bir patern izleyerek yayılırlar. Jukstaglomerüler komplekste bulunan hücrelerle sürekli temas halindedirler. Mezangiyum; glomerüler yapının desteklenmesi, kılcal damarların açık kalması ve filtrasyon oranının düzenlenmesinden sorumludur (15).

Mezangiyum matriksi sülfatlı glikozaminoglikanlar; fibronektin ve laminin içerir. Mezangiyum hücreleri birçok glomerülleri ilgilendien hastalıkta anahtar rol oynamaktadır. Hasara cevap olarak genellikle çok hızlı prolifere olurlar ve glomerül hasar seyrinde en son normale dönerler (16). Glomerül hastalıklarının moleküler yapısının anlaşılması, çok sayıda glomerülopatide mezangiyum hücrelerinin aldıkları rolleri ortaya koyacaktır.

Normal mezangiyum matriksi esas olarak tip 4 kollajen olmak üzere çok çeşitli ekstrasellüler matriks glikoproteinlerinden oluşur. Bunlar laminin, fibronektin, biglikan ve dekorindir (17). Mezangiyumda diğer ekstrasellüler matriks proteinlerine (fibrilin, MAGP, MP78 ve 340, kollajen tip 3) rastlamakta mümkündür. Tenaskin normal mezangiyumda az miktarda bulunurken hasara cevap koşullarında sentezinde artış söz konusudur (18).

Mezangiyum kökeniyle ilgili 3 tane teori bulunmaktadır. Bunlardan ilki; mezangiyum hücrelerinin metanefrik mezanşim kök hücrelerinden köken aldığına dairdir. İkinci teoride ise bu hücreler endotel hücrelerinden köken alırlar denmektedir (19). Başka bir teori ise; mezangiyum hücrelerinin endotel hücreleri ile birlikte glomerül içine dışarıdan göç ederek yerleştikleri şeklindedir (20).

Morfolojik olarak mezangiyum hücrelerinin dallanan sitoplazmik uzantıları vardır. Bu uzantılarda iyi gelişmiş filamentöz aktin bulunur. Çekirdek düzensiz şekillidir, kromatinin yoğunluğu çekirdeğin koyu görünmesini sağlar. Az sayıda intrasitoplazmik organel içerir. Mitokondriyon, endoplazma retikulumu, az miktarda lizozom, ribozom, polizom bulunur (21).

Farklı bir mezangiyum hücresi tipi Fc ve C3 reseptörlerini eksprese eder. Birkaç yıldır bunların kemik iliğinden köken aldığına dair bilgiler bulunmaktadır. Bu hücrelerde birinci tip hücrelere göre daha az intrasitoplazmik filamanlar bulunurken lizozom sayısı çok fazladır (22, 23). Hibrid hücreler her iki hücre özelliğini de taşırlar. Mezangiyum hücrelerinin normal düz kasdan makrofaj fenotipine

değişebileceği ve kimi patolojik durumlarda fagositoz yaparak görev alabileceğine dair bilgiler bulunmaktadır (24). Mezangiyum hücreleri; düz kas hücreleri ve makrofajların özelliklerine sahip perisitlerdir (25). Mezangiyum hücreleri mezangiyum mikro çevresinde meydana gelen minor değişiklikler sırasında, homeostazın korunması için biyolojik düzenleyicilerin salınmasından sorumludur (26, 27).

Mezangiyum hücreleri; kasılabilen, fagositoz yapabilen, çoğalabilme yeteneğinde olan, matriks ve kollajen sentezleyebilen, biyolojik olarak aktif maddeleri *(prostaglandinler*, *endotelinler)* salgılayan hücrelerdir. Endotelinler afferent ve efferent glomerüler arteriyollerin kasılmasını uyarırlar.

Normal mezangiyum yenilenme döngüsü sıkı kontrol altındadır, yeni matriks sentezi ve eski matriksin uzaklaştırılması dinamik bir denge içindedir (28). Mezangiyum matriksinin normal şartlar altında tutulmasında çok sayıda faktör görev alır. Asıl olarak mezangiyum homeostazında; matriks üretiminde aktive olan TGF-β , matriks imhasında ise MMP rol alır. MMPların kontrol altında tutulmasında TIMP, PAI, α2 makroglobulin ve diğer non-spesifik inhibitörler rol alır (29). Düzenleyici moleküllerdeki herhangi bir değişiklik; mezangiyum homeostazında ve hastalıkların morfolojik görünümlerinde değişime yol açar ve bu durum tanı kriteri olarak kullanılabilir (30, 31). Normal glomerül fonksiyonu ve patolojik değişikliklerin sonuçlarının anlaşılmasında, mezangiyum matriksinin miktar ve içeriğini belirleyen mekanizmaların belirlenmesi en fazla önem taşımaktadır.

Mezangiyum hücreleri çok sayıda sürekli ve geçici reseptörlere sahiptir. Bu reseptörler TGF-β, Ig A, Ig G, anjiotensin, LDL, ileri glikolizasyon bileşen ürünleri ve integrindir (32, 33, 34). Mezangiyum hücrelerinin Fc reseptörlerine sahip olması hayli ilginçtir. Bu reseptör bazı Ig subtiplerine ait Fc kısmına spesifiktir, bu reseptör makrofaj fenotipine sahip mezangiyum hücrelerinde eksprese edilir. Böylelikle mezangiyum hücreleri immün komplekslerle etkileşime girer ve immün kompleks kaynaklı glomerülopatilerde mezangiyum hücreleri rol almış olurlar (35).

Hafif zinzir glomerül hasarıyla ilgili bir çalışmada; hücresel değişimde bir takım önemli sinyal molekülleri bulunmuştur. Bunlar c-fos ve NF-kβ dır. Örneğin c-fos mezangiyum hücrelerinin proliferasyonunu ve yapısının tekrar düzenlenmesini sağlarken, NF-kβ temel olarak mezangiyum hücrelerinde sitokin sekresyonunu

düzenler (36). Gelecekte tedavinin potansiyel hedefi düzenleyici sinyal mekanizmaları olabilir.

Mezangiyum hücresine ait reseptörlerin çeşitli uyarıcı ve yaralayıcı ajanlarla etkileşimde olduğu tanımlanmıştır. Bu durumun hücresel değişime yol açtığı ve kontrol edilmezse irreversible patolojik etkilere neden olduğu bilinmektedir. PDGF-β aktivasyonu mezangiyum hücresinin proliferasyonuna neden olur (37). İlginç olarak TGF-β mezangiyum matriksi yaparken, mezangiyum hücreleri için antimitotik faktördür (38). Azalmış cmyc ekspresyonundan sonra epidermal büyüme faktör stimulasyonuna uğrayan epitel hücrelerinin proliferasyonu TGF-β ile antagonize edilir. TGF-β cmyc'in transkripsiyonunu azaltır (39).

İmmun ve non-immun kompleks kaynaklı böbrek hastalıklarında sitokinler ve mezangiyum hücreleri arasındaki etkileşimler çok sayıda mezangiyum matriks değişikliklerine neden olur (40). İnflamatuar hücrelerden; mezangiyum hücre proliferasyonu ve matriks üretimini stimüle eden faktörler salınır (41). Patolojik süreçlerde mezangiyum matriksi ilk olarak değişime uğrayan alanlardan biridir. Matriks bu süreç içerisinde iyice yayılır, normal kompozisyonundan ayrılır. Eğer patolojk hasar kontrol altına alınmazsa glomerüloskleroz oluşur, mezangiyum değişimi morfolojik ve biyokimyasal olarak belirgin hale gelir böylece mezangiyum tamiri ve normale dönüşümü imkansız hal alır (42).

Hasara cevap mezangiyum hücrelerinde 'trans' veya 'de' diferansiyasyon şeklinde olur. Mezangiyum hasarında karekteristik cevap; düz kas fenotipinden (mezangiosit) embriyonik miyofibroblastik fenotipe (mezangioblast) değişim şeklinde olur (43). Transforme miyofibroblastik mezangiyum hücreleri baskın olarak granüllü endoplazma retikulumu, ribozom ve polizomlar kazanırlar, hücrelerde meydana gelen bu değişimler artan aktif protein sentezini yansıtmaktadır. Eğer bu sentez aktivitesi kontrol edilemezse glomerüloskleroz ortaya çıkabilir (44).

Miyofibroblastik fenotipe değişim mezangiyum matriksinde de benzer değişimlere neden olur. Miyofibroblastik fenotipli mezangiyum hücreleri normalde mezangiyumda bulunmayan çok çeşitli ekstrasellüler matriks proteini sentezler. Bu proteinler daha çok tip 1ve tip 3 kollajendir, bunların yok edilmesi oldukça güçtür (45). Mezangiyum hücrelerindeki, tip 4 kollajenden tip 1 ve 3 kollajen üretimine olan

ani değişiklik major patolojik sonuçlar doğurur ve glomerüloskleroz gelişiminde ana sorumlu etkendir (46).

Mezangiyum hücrelerinin makrofaj fenotipine transforme olması onların aktif endositozlar ve lizozomlar kazanmasına neden olur, bu seyirde hücreler az veya çok miktarda düz kas yeteneklerini kaybederler (44).

Glomerüler hasar sonucu mezangiyum matriks değişimleri çok çeşitli olabilir, bazı vakalarda mezangiyolizis olur. Bu durum tipik olarak trombotik mikroanjiopati ve amiloidozisde olur. Trombotik mikroanjiopatide glomerüler kollabs gelişir mezangiyum matriksi görünmez olur. Amiloidozisde mezangiyum fibriler materyal ile yer değiştirir (24). Matriks içeriği normalde bulunmayan bileşenlerle de başkalaşabilir. Bunlar daha çok tip 1, 3 kollajen ve tenaskindir. Tenaskin; keloid ve pulmoner fibrozis vakalarında gösterilmiştir. Bu proteinin mezangiyumda bulunan metalloproteinazlar ile sindirilmesi çok güçtür (47). Tenaskin sıklıkla sklerotik nodüllerin santralinde bulunur ve bu alanlar segmental glomerülosklerozis ile birliktedir (48).

2.5. Diyabetik Nefropati

DM; böbrek fonksiyonlarını bozar ve morfolojisini değiştirir. Böbrekte meydana gelen bu değişiklikler diyabetik nefropati olarak adlandırılır (49). Nefropati diyabete bağlı ölümlerin başında gelmektedir. Ölümler daha çok proteinürili hastalarda gerçekleşmektedir (50).

DM' un iki formu bulunmaktadır. Her iki form da hiperglisemiye ve çeşitli sekonder metabolik anormalliklere neden olmaktadır (51).

İnsulin bağımlı DM, Tip 1 DM; endojen insulin üretiminin kaybıyla birliktedir. Sıklıkla genç yaştaki insanlarda ortaya çıkmaktadır, bu insanlarda diyabetik ketoasidoz epizodları görülmektedir (51).

İnsulin bağımsız DM, Tip 2 DM; bitmemiş ancak azalmış olan insulin üretimiyle birliktedir. Bu hastalarda insulin aktivasyonuna periferik organ düzeyinde direnç söz konusudur. Tip 2 diyabetli hastalar daha yaşlı populasyondur, nadiren diyabetik ketoasidoz episodlarına rastlanır (51). Diyabetik nefropati her iki diyabet formunda da izlenir. Diyabetik nefropatiye bağlı böbrek yetmezliği tip 1 DM hastalarının %25-35' inde, tip 2 DM hastaların %15- 25' inde görülmektedir (51).

DM ile ilişikli spesifik glomerüler lezyonlar ilk olarak 1936 yılında Kimmelstiel ve Wilson tarafından tanımlanmıştır (52).

Tip 1 ve tip 2 DM hastalarında; diyabetik nefropatinin kliniği, proteinüri, glomerül filtrasyon hızında azalma, kan basıncında artış birbirine benzer iken böbrek lezyonlarında farklılıklar olabilir (53). Tip 1 DM hastalarında özellikle tübüler, interstisiyel ve arteriyolar lezyonlar oluşurken en önemli yapısal değişiklikler glomerülde meydana gelir. Diğer yandan tip 2 DM hastalarında mikroalbuminüri veya proteinüri varlığına rağmen normal glomerül yapısı ve/veya tübülointerstisiyel ve arteriyol düzeyinde anormallikler saptanabilir (53).

Böbrek fonksiyon parametreleri tip 1 ve tip 2 DM' da böbrek yapısal değişiklikleri ile yakından ilişkilidir, özellikle mezangiyumda ki genişleme yapılan çalışmalarda hasara cevap olarak saptanmıştır (53).

Tip 1 diyabete bağlı glomerülopatide en önemli lezyon GBM' ın kalınlaşması ve mezangiyumun genişlemesidir. GBM' ın kalınlaşması ilk ölçülebilen değişimdir, tip 1 DM tanısı konulduktan sonra en erken 1,5- 2,5 yıl sonra başlamaktadır. Tip 1 DM'da ek olarak glomerül büyümesi, TBM kalınlaşması, tübüler atrofi, interstisiyel genişleme, afferent ve efferent arteriyollerde hyalinozis görülmektedir (54).

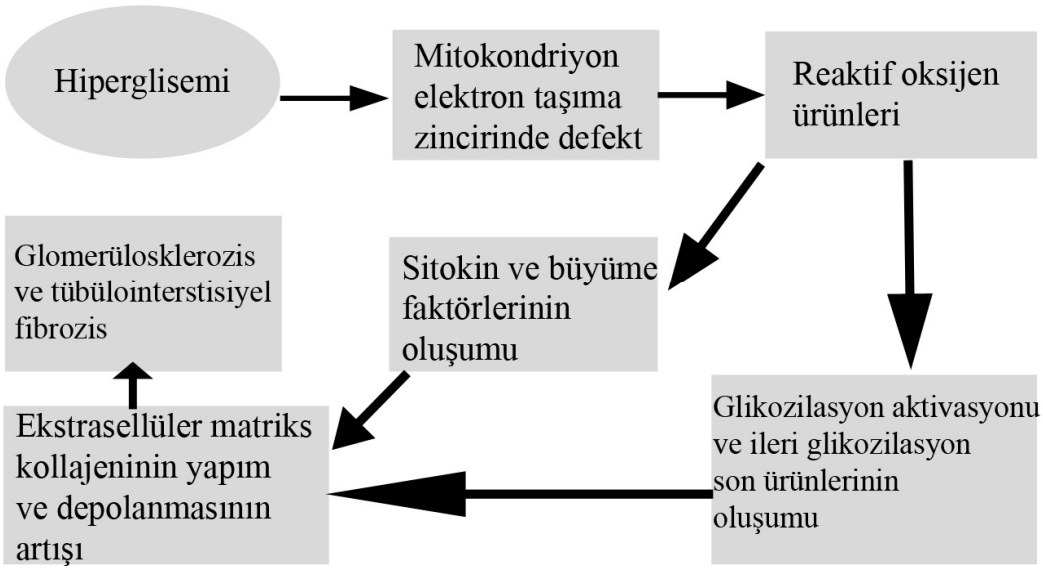
Normal populasyonla değerlendirildiğinde tip 1 DM'lu hastalarda daha sık oranda nefrotik sendrom ve membranöz nefropati görülmektedir (50).

Hem mezangiyum genişlemesi hem de GBM'ın kalınlaşmasında ekstrasellüler matriks birikimi söz konusudur. Ekstrasellüler matriks ürünleri olarak tip 4, 5 kollajen, laminin, fibronektin saptanmaktadır. GBM ve mezangiyumdaki birikimlerin meydana gelmesinde bu glikoproteinlerin üretiminde ki artış mı, yok edilmesindeki azalma mı yoksa her ikisi birlikte mi etken olmaktadır? Bu durum hala açıklığa kavuşamamıştır (54). Mezangiyum matriks komponentinde artış olduktan sonra mezangiyumda genişleme meydana gelir ve bu genişleme en erken, diyabetin ortaya çıkmasından 5-7 yıl sonra saptanabilir (54).

Diyabetik nefropatinin patogenezi çok iyi anlaşılamamıştır. Ancak yapılan çalışmalarda hiperglisemi en önemli etken olarak ortaya çıkmaktadır. Glikoz düzeyinin zayıf kontrolü diyabetik nefropatinin predizpozan faktörüdür (51).

İleri glikozilasyon ürünleri diyabetik nefropati gelişiminde oldukça önemlidir (52). Proteinlerin glikozilasyonu sonucu oluşan ileri glikozilasyon ürünleri, diğer

proteinlerin amino gruplarına kovalent olarak bağlanma özelliğine sahiptir. Bunun sonucunda çapraz bağlanmalar gerçekleşir. Kollajen ve diğer matriks ürünlerindeki ileri glikozilasyon son ürünleri; endotel hücrelerinin adezyonunu ve replikasyonunu, mezangiyum hücrelerinin vazokonstrüksiyonunu ve büyümesini azaltmaktadır. Diğer yandan lipoproteinlerin, monositlerin ve makrofajların immun komplekslere yapışmasını arttırmaktadır. İleri glikozilasyon son ürünleri diyabetik hastaların genişlemiş mezangiyumunda izlenirken diyabet yönünden sağlıklı kişilerin mezangiyum bölgesinde bulunmamaktadır (52). İleri glikozilasyon son ürünlerinin diyabetik hayvan modellerinde inhibe edilmesi albuminürinin azalmasına neden olmaktadır. DM'da başka bir hasar mekanizması olarak da sorbitol oluşumunu sağlayan aldoz redüktaz enzimi gösterilmektedir. (51)



Şekil 2.5.1. Diyabetik nefropatide, böbrek mezangiyumu ve interstisiyel alanda sklerozisin oluşum mekanizması.

Diyabetik nefropatide hemodinamik değişikliklerde oluşur. Herhangi bir böbrek hastalığı klinik kanıtı olmadan önce, diyabetik nefropatinin erken evresinde glomerül filtrasyon hızında %20-50'lik bir artış söz konusudur. Diyabetin erken evresinde hiperfiltrasyon nedeniyle glomerüller oldukça genişler, bu genişleme artan glomerül filtrasyon hızı ile koreledir (51).

Glomerüllerde meydana gelen vasküler değişiklikler retina damarlarında da olmaktadır. Sıklıkla nefropati retinopati ile birliktedir. Tip 1 DM' lu hastaların %90 ından ve tip 2 DM'lu hastaların %50 sinden fazlasında diyabetik retinopati gelişmektedir (51).

Yapılan çalışmalarda diyabetik hastalarda böbrek hastalıklarının oluşmasında genetiğin predizpozan bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Diyabetli Afrikalılarda, beyazlara oranla nefropati gelişim riski daha fazladır (51).

Laboratuar incelemesi olarak diyabetin başlangıç bulgusu mikroalbuminüridir. 24 saatik idrarda 30-300 mg arası albumin varlığı ile tanı konulur. Diyabetin başlangıç evresinde mikroalbuminürisi olan hastalarda nefropati gelişme oranı çok yüksektir. Yine kardiyovasküler ölümler, erken evrede mikroalbuminürisi olan hastalarda daha yüksektir (51).

Diyabetik nefropatide özellikle mezangiyumda değişiklikler meydana gelir. Öncelikle mezangiyum hücre sayısında ve ardından da mezangiyum matriksinde artış izlenir (52). Matriksde artan ana komponent tip 4 kollajendir. Biriken diğer komponentler tip 5, 6 kollajen, laminin ve fibronektindir (52).

İlerlemiş diyabetik nefropatide (Kimmelstiel-Wilson hastalığı) hipertansiyon ve artmış şiddetli proteinüri saptanır (49). Bu hastalarda serum üre nitrojeni ve kreatinin değerleri yüksektir, böbrek yetmezliğinin metabolik problemleri ortaya çıkar, hiperpotasemi ve asidozis izlenir. Diyabetik nefropatili hastalarda mikrohematüri de izlenebilir. Ancak bu durum nadir olarak ortaya çıkar. Ortaya çıktığında da beraberinde papiller nekroz ve böbrek taşı olabilir (49).

Hücre kültürü çalışmalarında yüksek glikoz içeren medyum içine alınan mezangiyum hücrelerinde tip 4 kollajen ve diğer matriks komponentlerinin sentezi artmıştır. TGF-β glikozun mezangiyum hücreleri üzerindeki etkisinde en önemli mediyatördür (52). Büyüme hormonu oranı diyabetik hastalarda artmaktadır. Yine yüksek glikoz konsatrayonu IGF aktivitesini artırmaktadır. IGF ve TGF-β nın kültüre edilmiş mezangiyum hücrelerindeki etkileri karşılaştırıldığında; her iki büyüme faktörü de fibronektin, laminin ve tip 4 kollajen sentezini arttırmaktadır. Ancak TGF-β'nın daha potent olduğu saptanmıştır (52).

Diyabetik nefropatiye bağlı son dönem böbreği küçük veya normal büyüklüktedir. Düzensiz ve granüler yüzeye sahiptir. Böbrekte derin skarlar, papiller

nekroz izlenebilir. Birçok araştırmacı transplantasyon yapılan son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda; transplante böbreklerde tekrarlayan diyabetik glomerülosklerozis saptamıştır (42).

Nefropatinin ilerlemesini önlemede tedavi yöntemi olarak glomerüler hiperfiltrayonu azaltmaya yönelik diyetteki protein ve fosfor miktarında kısıtlama etkili olmaktadır. Yine ACE inhibitörleri (kaptopril, enalapril) böbrek hasarına karşın koruyucu olarak kullanılabilir. Bu ajanların glomerülün hemodinamisini düzenlemede, hiperfiltrasyonu, hipertrofiyi inhibe edici ve sistemik kan basıncını düşürücü etkileri bulunmaktadır (52).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Dokuların Elde Edilmesi

Deney hayvanları üzerinde yaptığımız bu çalışma Ankara Üniversitesi Etik Kurulu'nun 13.02.2008 tarih ve 2008-19-76 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda ağırlıkları 200-250 g arasında olan, 20 adet yaklaşık üç aylık, erkek Wistar tipi beyaz sıçan kullanıldı. Genetik değişkenliği en aza indirmek için tüm hayvanlar aynı kaynaktan alındı. Sıçanların yeni ortamlarına alışmaları ve akut ya da kronik herhangi bir hastalıkları olmadığının teyidi için 1 hafta beklendi. Hayvanlar tüm deneyler boyunca Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik ABD hayvan laboratuvarları kontrollü çevre koşullarında bulunduruldular. Sıçanlar, belirlenen deney süresi olan 5 hafta boyunca kafes başına üç hayvandan fazla olmamak şartıyla kısıtlama olmaksızın standart laboratuvar kemirgeni yemiyle beslendiler. Deney hayvanlarına su limitsiz olarak verildi, hayvanların günlük ağırlık ölçümü yapıldı.

Çalışmamızda; deneysel yöntemle diyabet oluşturmak için streptomyces achromogenes tarafından üretilen bir antibiyotik olan Streptozotosin (STZ, Sigma) kullanıldı. STZ N-asetilglikozamin analoğudur, pankreas β hücresine GLUT-2 ile taşınmaktadır. Hücre içerisinde biriken STZ ile reaktif oksijen radikalleri oluşur ve bunun sonucunda pankreas β hücrelerinde hasar gerçekleşir (55, 56).

Sitrat tamponu (0.1 M, pH 4.5) içerisinde eritilen STZ; 50 mg/kg olacak şekilde tek doz halinde sıçanların intraperitoneal (i.p.) bölgesine enjekte edildi (57, 58). Enjeksiyondan bir hafta sonra MediSense Card Sensor ile sıçanların kuyruk veninden kan şekeri ölçümü yapıldı. Bu ölçüme göre kan şekeri, 300 mg/dl ve bu değerin üstünde olan sıçanlar diyabetik olarak değerlendirildi ve deneye alındı. Kan şekeri bu değere ulaşmamış olan sıçanlar ise deneye alınmadılar. Diyabet grubunda 10 sıçan değerlendirildi.

Kontrol grubu için 10 adet 200-250 g ağırlığındaki Wistar sıçan kullanıldı. Kontrol grubu hayvanlarına sadece sitrat tamponu (0.1 M, pH 4.5) tek doz i.p. olarak enjekte edildi.

Enjeksiyondan sonraki beşinci haftada, sıçanların ağırlıkları ve kan şekerleri tekrar ölçüldükten sonra ketamin ksilazin aneztezisi yapılarak sıçanlar sakrifiye edildi. Cerrahi prosedür sırasında sıçanlar karın orta hattından kesildi, böbreklere ulaşıldı, öncelikle böbrek arteri kesilerek, bir böbrek örneği %10'luk tamponlu formaline, diğer böbrek longitudinal olarak iki eşit parçaya kesilerek bir yarısı %4'lük paraformaldehit içerisine kalan yarısı da %2,5'luk gluteraldehit içerisine alındı. Histolojik incelemelerin tümü Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuarlarında yürütüldü.

3.2. Işık Mikroskobisi İçin Yapılan Çalışmalar

Kontrol ve diyabet gruplarına ait sıçan böbrek dokuları organ dışındaki kapsül soyularak %10'luk tamponlu formaline alındı. En az 48-72 saat formalinde fikse olan dokular rutin histolojik tespit ve takip işlemlerine alındı. Dokular öncelikle akan su altında 15-20 dakika yıkandı. Sırasıyla birer saat iki kez %75 ve %96'lık etanole alındı. Dokular ikinci %96'lık etanolde bir gece bekletildikten sonra ertesi sabah iki kere %100'lük etanolde birer saat süreyle dehidrate edildi. Dehidratasyon işleminden sonra ksilen ile şeffaflandırılan dokular iki değişim sıvı parafinle 60 ^{0}C de 3 saat inkübe edildi. Parafin infiltrasyonundan sonra örnekler kesit yüzeyi aşağı gelecek şekilde parafin bloklara gömüldü. Bloklar buzdolabında +4 derecede bekletildi.

Bloklar donduktan sonra mikrotom aleti ile 3µm kesitler alındı. Lam üzerine alınan kesitler 60 ^{0}C'lik etüvde parafinin erimesi için 1,5 saat bırakıldı. Kesitler rutin inceleme için hematoksilen-eozin, böbrek dokusunda farklı yapıları inceleyebilmek için özel boyalar olarak Mallory Azan, Masson'un Trikrom, PAS, Alsiyan mavisi-PAS, Silver metamin gümüşleme ve Oil Red O ile boyandı.

3.2.1. <u>Hematoksilen-Eozin boyası protokolü:</u>

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100 - %96 - %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Suda yıkama
- Harris'in Hematoksileni, 1 dakika
- Suda yıkama

- Eozin, 1 dakika
- Suda yıkama
- %75 - %96 - %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellanla kapama

3.2.2. Mallory Azan boyası protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100 - %96 - %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Suda yıkama
- %0.1 (w/v) Azokarmin G solüsyonu, 1 saat, 60 ^{0}C
- Suda yıkama
- %1 anilin alkolde farklandırma
- %1 asetik alkolde durulama
- %5 fosfotungstik asitle mordanlama, 30 dakika
- Suda yıkama
- %0.25 (w/v) anilin mavisi- %1 orange G solüsyonu, 1 saat
- Suda yıkama
- %75 - %96 - %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellanla kapama

3.2.3. Periyodik Asit Schiff boyası protokolü:

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100 - %96 - %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Suda yıkama
- Periyodik asit solusyonu, 10 dakika
- Suda yıkama
- Schiff solüsyonu, 15 dakika
- Metabisülfit solüsyonu, 3 er şale, 3 er dakika
- Suda yıkama

- %75 - %96 - %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellanla kapama

3.2.4. Alsiyan mavisi- Periyodik asit Schiff boyası protokolü:

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100 - %96 - %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Suda yıkama
- Alsiyan mavisi solüsyonu (50 ml %1 alsiyan mavisi + 50 ml %1 asetik asit), 30 dakika
- Suda yıkama
- %1'lik fosfomolibden asit, 6 dakika
- Suda yıkama, suyun rengi yeşil olmalı
- %8'lik periyodik asit, 10 dakika
- Suda yıkama
- Schiff solüsyonu, karanlıkta, 15 dakika
- 15 ml sodyum bisülfit+ 15 ml %10 HCl+ 30 ml distile su, 3 şale, 2 dakika
- Suda yıkama
- %75 - %96 - %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellanla kapama

3.2.5. Masson'un Trikrom boyası protokolü:

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100 - %96 etanol serisi ile hidratasyon
- Suda yıkama
- Bouin's solüsyonu, 56 ^{0}C'de, 1 saat
- Sarı rengi akana kadar suda yıkama
- Distile su
- Demirli hematoksilen, 5 dakika
- Suda yıkama

- %1'lik Biebrich Scarlet asit fuksin solüsyonu, 10 dakika
- Distile su
- %5'lik fosfotungstik asit, 5 dakika
- %2'lik light green + %1'lik asetik asit, 1 dakika
- Distile su
- %1'lik asetik asit, 3 dakika
- %96 - %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellanla kapama

3.2.6. Metamin gümüşleme boyası protokolü:

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100 - %96 - %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Suda yıkama
- Gümüş nitrat solüsyonu, 56 ^{0}C'de, 1,5 saat
- Distile su
- %1'lik altın klorid, 30 saniye
- Distile su
- Sodyum tiyosülfat, 2 dakika
- Suda yıkama
- Heindens hematoksilen, 1 dakika
- Suda yıkama
- %75 - %96 - %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellanla kapama

3.2.7. Oil Red O boyası protokolü:

- Frozen kesitler %70'lik alkolde 3-5 saniye
- Oil red O solüsyonunda 5 dakika
- %70'lik alkolde yıkama
- Distile suda yıkama

- Harris hematoksilende 2 dakika
- Çeşme suyunda yıkama
- Gliserin jel ile kapatma

Boyanarak hazırlanan preparatlar, kurumalarının ardından Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobu ile incelendi ve fotoğraflandı.

3.3. Konfokal Mikroskop İçin Yapılan Çalışmalar

Kontrol ve diyabet gruplarına ait böbrek dokuları %4'lük paraformaldehide alınarak 24 saat oda ısısında tespit edildikten sonra;

- %20'lik sükroz içerisinde 1 gün boyunca
- %30'luk sükroz içerisinde dokular dibe çökene kadar takip edildi.

Ardından dokular kriyomatriks içerisine gömüldü. Çalışma ısısı -20 ^{0}C ayarlanmış kriyomikrotomda 10 µm'lik kesitler poli-L-lizin kaplı lamlara alındı, laminin ve α-düz kas aktini (α-smooth muscle actin= ASMA) boyamaları yapıldı.

3.3.1 Laminin boyama protokolü:

- PBS ile 2 defa yıkama, 30 dakika
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Laminin B2/ γ1 Ab-2 (Clone D18) fare monoklonal anti-sıçan IgG (Thermo Scientific, katolog no: MS-1356-R7, UK), 90 dakika, 37 ^{0}C'lik etüvde
- PBS ile 2 defa yıkama, 5 dakika
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi anti-fare IgG (Jackson, katalog no: 115-095-100, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 90 dakika, 37 ^{0}C'lik etüvde
- PBS ile 2 defa yıkama, 5 dakika
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- To-pro-3 (Molecular Probes, katolog no: T-3605, ABD), 100 nM, 30 dakika, 37 ^{0}C'lik etüvde
- PBS ile 2 defa yıkama, 5 dakika
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliserol ile)

3.3.2. <u>ASMA boyama protokolü:</u>

- PBS ile 2 defa yıkama, 30 dakika
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- ASMA fare monoklonal anti-sıçan IgG (Sigma, katolog no: A5228, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 90 dakika, 37 ^{0}C'lik etüvde
- PBS ile 2 defa yıkama, 5 dakika
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi anti-fare IgG (Jackson, katalog no: 115-095-100, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 90 dakika, 37 ^{0}C'lik etüvde
- PBS ile 2 defa yıkama, 5 dakika
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- To-pro-3 (Molecular Probes, katolog no: T-3605, ABD), 100 nM, 30 dakika, 37 ^{0}C'lik etüvde
- PBS ile 2 defa yıkama, 5 dakika
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliserol ile)

İmmünofloresan görüntülemeler Zeiss LSM 510 lazer taramalı konfokal mikroskop sistemi altında alındı.

3.4. Elektron Mikroskop İçin Yapılan Çalışmalar

Kontrol ve diyabet gruplarına ait böbrek dokuları ince parçalar halinde %2,5'luk gluteraldehit içerisine alındı. Ardından elektron mikroskobisi tespit ve takip işlemleri yapıldı.

- Ön tespit (1. tespit): Böbrek dokuları 0.2 M fosfat tamponu içinde % 2,5 gluteraldehit ve % 2 paraformaldehit içeren 1. tespit sıvısında +4 °C'de 2-3 saat bekletildi
- 1. Yıkama: 0.1 M fosfat tamponunda (2x 15 dakika, rotatorda)
- Postfiksasyon (2. tespit): 0.1 M fosfat tamponu içinde % 1 OsO_4 (rotatorda ve karanlıkta, 2-3 saat)
- 2. Yıkama: 0.1 M fosfat tamponunda (3x 20 dakika)
- Distile su ile yıkama

- Blok boyama: % 70 etanolde % 0,5 uranil asetat ve % 1 fosfotungstik asitle (rotatorda, karanlıkta 2 saat)
- Dehidratasyon: % 70, % 96, % 100 alkol, propilen oksit
- 1:1 propilen/Araldite (rotatorda 1 saat)
- Araldite (2 saat)
- Gömme (Bloklama): Kapsül içine böbrek dokuları kondu. Araldite parçaların üzerine eklendi
- Polimerizasyon: Araldite blokları 80°C'de (1 gece) tutuldu, sonrasında etüv kapatıldı ve bloklar kendi halinde soğumaya bırakıldı.

3.4.1 Yarı ince kesit boyama protokolü:

- Ultramikrotomla 700 -1000 nm kalınlığındaki kesitler alındı
- Kesitler ısıtıcıda kurutuldu
- Distile su içinde % 1 boraks, % 1 toluidin mavisi, % 1 Azur II içeren toluidin mavisi/azur II boyasıyla boyandı (50- 60 °C ısıtıcıda boya kuruyana kadar)
- Distile su ile yıkandı
- Kesitler tekrar ısıtıcıya kondu
- Kesitler kurutuldu ve soğuduktan sonra ksilene kondu
- Entellanla kapatıldı

Boyanarak hazırlanan preparatlar, kurumalarının ardından Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobu ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.4.2. İnce kesit boyama protokolü:

- Ultramikrotomla 70-90 nm kalınlığında kesitler alındı
- Kesitler boyama setine yerleştirildi
- Distile suda 1-2 dakika
- %8'lik uranil asetatta 45 dakika
- Distile suda 1-2 dakika
- 0,1 N NaOH
- % 0,7 kurşun sitrat+ % 0,9 sodyum sitrat solüsyonunda 20 dakika

- 0,1 N NaOH’ de yıkandı
- Distile suda 1-2 dakika yıkandı

Boyanan gridler kurutma kağıdına alınarak grid kutusuna yerleştirildi. Görüntülemeler LEO 906 E TEM de incelenerek fotoğraflandı.

4. BULGULAR

4.1. Kontrol ve Deney Grubunda Bulunan Sıçanların Deney Başlangıç ve Sonundaki, Ağırlık ve Kan Şekerleri Değerleri İle İlgili Bulgular

Kontrol grubuna ayrılan sıçanların deney başlangıcı ve sonunda vücut ağırlıkları ve kan şekeri düzeylerinde anlamlı bir faklılık bulunmazken; deney grubuna ayrılan 50 mg/kg i.p. STZ kullanılarak diyabet oluşturulmuş sıçanların deney başlangıç ve 5 hafta sonundaki ağırlık değerleri ve kan şekeri düzeylerinde belirgin fark saptandı. Deneyin başlangıcındaki değerlere göre sıçanların vücut ağırlıklarında azalma, kan şekeri düzeylerinde yaklaşık beş katlık artış belirlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Kontrol ve deney grubunun deney başlangıç ve sonundaki ağırlık ve kan şekeri düzeyleri.

GRUPLAR	BAŞLANGIÇ AĞIRLIKLARI (gr)	BAŞLANGIÇ KAN ŞEKERİ DEĞERLERİ (mg/dl)	DENEY SONU AĞIRLIKLARI (gr)	DENEY SONU KAN ŞEKERİ DEĞERLERİ (mg/dl)
Kontrol-1	225	95	224	100
Kontrol-2	226	100	232	110
Kontrol-3	237	102	238	108
Kontrol-4	230	105	235	110
Kontrol-5	231	98	236	100
Kontrol-6	200	97	222	100
Kontrol-7	240	100	250	105
Kontrol-8	230	96	235	100
Kontrol-9	212	90	218	106
Kontrol-10	228	110	230	112
Deney-1	224	110	224	513
Deney-2	198	102	195	484
Deney-3	221	108	190	551
Deney-4	231	99	185	600
Deney-5	228	95	168	555
Deney-6	214	101	231	435
Deney-7	225	100	170	500
Deney-8	224	98	175	540
Deney-9	230	100	189	530
Deney-10	235	105	195	550

4.1.1 İstatistiksel Analiz

Kontrol ve deney grubuna ait deney öncesi ve sonrası; ağırlık ve kan şekerleri değerlerindeki değişiklikler Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Kontrol ve deney grubunda başlangıç ağırlıkları ve kan şekerleri arasında anlamlı fark saptanmadı. Kontrol grubunda deney sonu ağırlıklarında; %2,17'lik bir artış varken deney grubunda %17,42'lik bir azalma saptandı, bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı. Deney sonundaki kan şekerleri değerlerinde ise kontrol grubunda %4,88'lik artış görülürken deney grubunda %416,99'luk bir artış izlendi (Tablo 4.1.1).

Tablo 4.1.1 Konrol ve deney grubuna ait deney başlangıç ve sonundaki ağırlık ve kan şekerinin Mann Whitney U testine göre istatistiksel sonuçları.

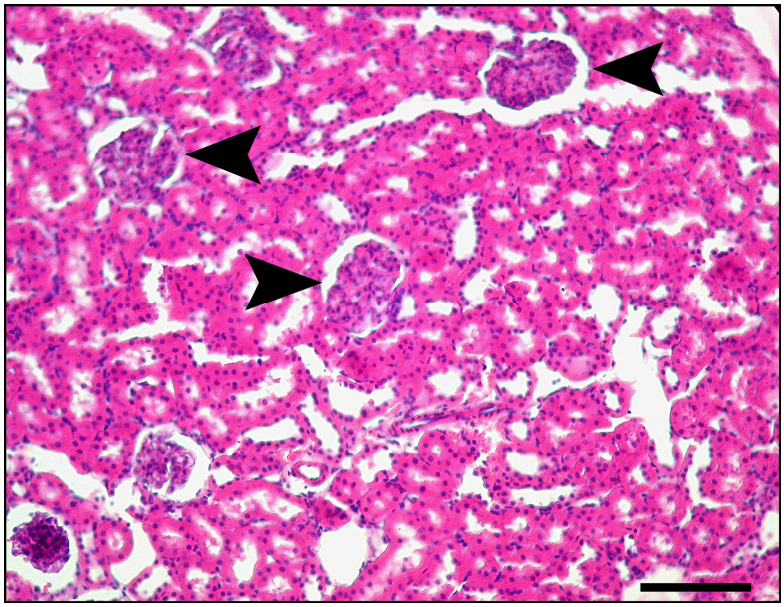
	Kontrol		Deney		p
	Medyan(min.-maks.)	Ortalama±Std	Medyan(min.-maks.)	Ortalama±Std	
Ağırlık (Başlangıç)	229 (200-240)	225,9±11,79	224,5 (198-235)	223±10,53	0,315
Kan Şekeri (Başlangıç)	99 (90-110)	99,3±5,56	100,5 (95-110)	101,8±4,61	0,280
Ağırlık (Sonra)	233,5 (218-250)	232±9,17	189,5 (168-231)	192,2±21,01	<0,001
Kan Şekeri (Sonra)	105,5 (100-112)	105,1±4,81	535 (435-600)	525,8±45,48	<0,001
Ağırlık Yüzde Değişim	-2,17	-2,80±3,16	17,42	13,49±11,60	0,002
Kan şekeri yüzde değisim	-4,88	-5,9±4,74	-416,99	-417,68±53,7	<0,001

p değerleri Mann Whitney U testinden elde edilmiştir.
Yüzde değişim = ((önce-sonra)/önce)*100

4.2. Kontrol Grubunun Işık Mikroskobik Bulguları

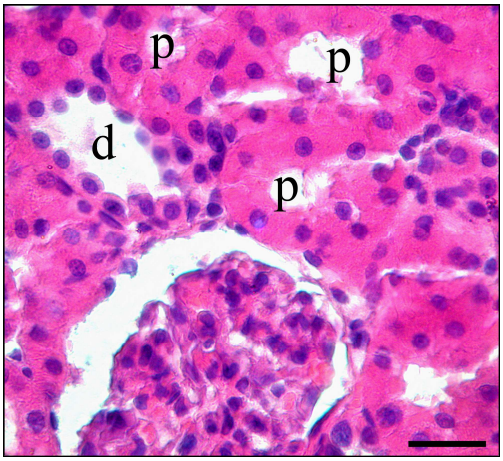
Kontrol grubuna ayrılan sıçan böbrek dokularının farklı boyalar kullanılarak incelenen kesitlerinde; böbrek cisimcikleri, proksimal ve distal tübülüsler, interstisiyel alan ve damarlar değerlendirildi. Hematoksilen-Eozin boyamalarında böbrek cisimciğini oluşturan Bowman kapsülü ve glomerül yumağı normal histolojik görünümleri ile izlendi. Bowman kapsülünün dış yaprağını oluşturan pariyetal epitel hücreleri ince bir membran üzerine düzgün bir şekilde oturmuş olarak gözlendi.

İncelen kesitlerdeki tüm böbrek cisimciklerinde pariyetal ve visseral epitel hücreleri arasında Bowman aralığı normal genişlikteydi (Şekil 4.2.1).



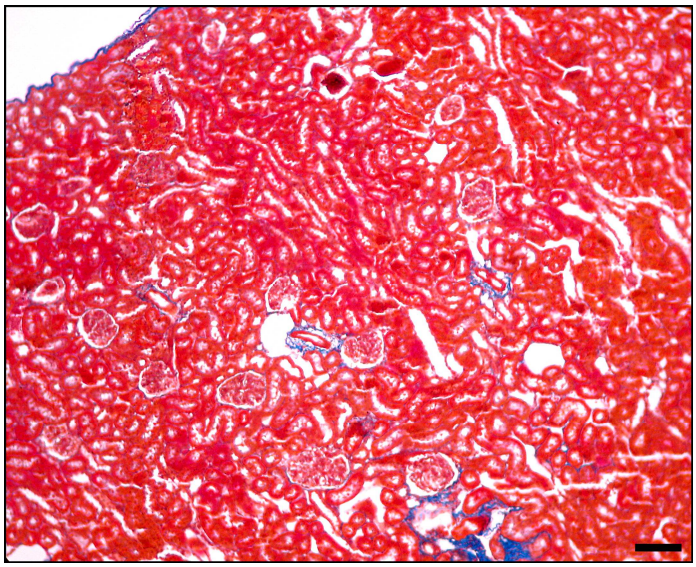
Şekil 4.2.1 Kontrol grubu böbrek dokusu kesiti. Düzgün sınırlı toparlak şekilli böbrek cisimcikleri (ok başı). Hematoksilen Eozin Bar:100 µm

Böbrek cisimciğinin çevresinde proksimal tübülüs epitel hücreleri asidofil sitoplazmaları, orta duruşlu, yuvarlak çekirdekleri ve apikal yüzlerinde belirgin fırçamsı kenarları ile görüldü. Bazı proksimal tübülüs lümenleri yıldız şeklindeki görünümleriyle dikkati çekti. Distal tübülüsler geniş lümenleri ve tüp kesitindeki çekirdek sayısının fazlalığı ile proksimal tübülüslerden kolayca ayırt ediliyordu (Şekil 4.2.2).



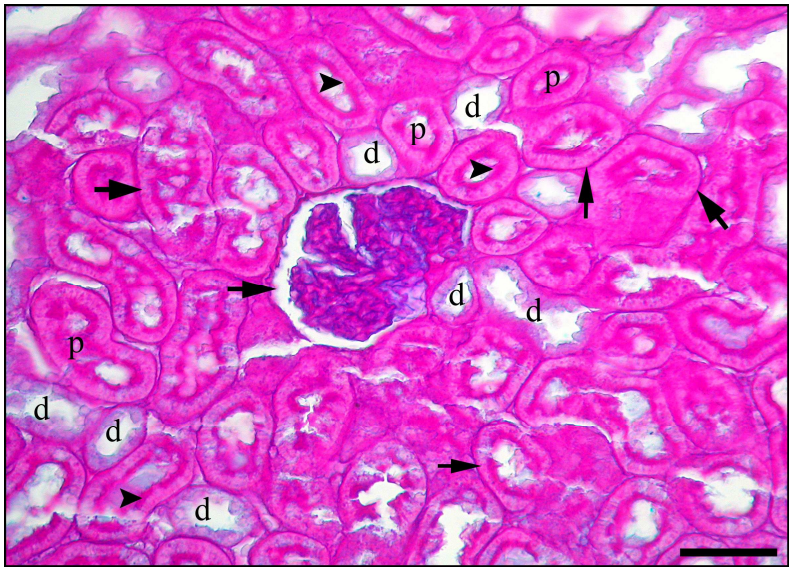
Şekil 4.2.2 Kontrol grubu böbrek dokusu kesiti. Proksimal tübülüs yıldız şekilli lümeni, asidofil sitoplazması ile gözlenmekte (p). Distal tübülüs geniş lümeni ve lümeni çevreleyen çok sayıda çekirdek içeren görünümü ile izlenmekte (d) Hematoksilen Eozin Bar: 20 µm

Kontrol grubuna ait böbrek dokusu kesitlerinde böbrek kapsülünü oluşturan kollajen lifler, Mallory Azan boyası içeriğinde bulunan anilin mavisi ile mavi renkte boyanmış olarak gözlendi. Böbrek cisimcikleri, tübülüsler ve interstisiyel doku normal yapısı ile izlendi (Şekil 4.2.3).



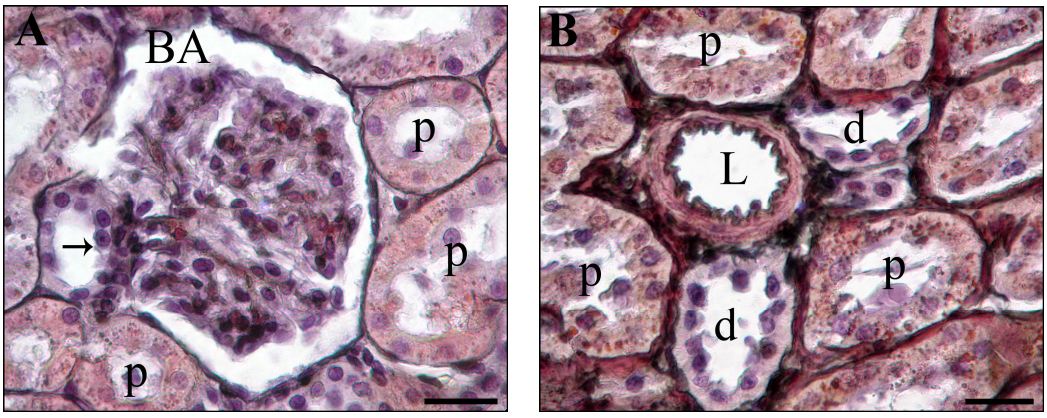
Şekil 4.2.3 Kontrol grubu böbrek dokusu kesiti. Mallory-Azan Bar:100 µm

Kontrol grubuna ait böbrek dokusunun kesitlerinin alsiyan mavisi-PAS boyamalarında böbrek cisimcikleri normal görünümündeydi. Pariyetal yaprak hücrelerinin bazal membranı ve glomerül kılcallarına ait bazal membranlar PAS boyası ile belirgin olarak boyandı. Proksimal tübülüs epitel hücrelerinin apikal yüzlerindeki fırçamsı kenarları PAS pozitif reaksiyon verdi. Proksimal ve distal tübülüslere ait bazal membranlar düzgün sınırları ve kalınlıklarıyla dikkati çekti (Şekil 4.2.4).



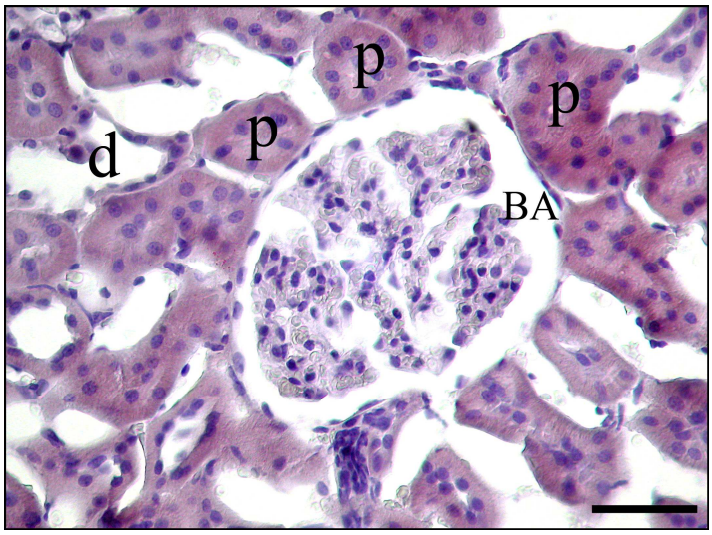
Şekil 4.2.4 Kontrol grubu böbrek dokusu kesiti. PAS pozitif reaksiyon veren Bowman yaprağına ait pariyetal epitel, proksimal ve distal tübülüs epitel bazal membranları (ok), proksimal tübülüs fırçamsı kenarları (ok başı), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d) Alsiyan mavisi-PAS Bar: 50 µm

Kontrol grubuna ait böbrek dokusunun gümüşleme yöntemiyle boyanan kesitlerinde böbrek cisimcikleri, Bowman aralığı, pariyetal yaprak bazal membranı, glomerül kılcal damarları ve mezangiyum bölgesi normal görünümündeydi. Tübülüs bazal membranları, böbrek cisimciğinin damar kutbunda distal tübülüse ait hücrelerce oluşturulan makula densa, tüpler arasında yer alan damarlar düzgün yapılarıyla gözlendi (Şekil 4.2.5 A-B).



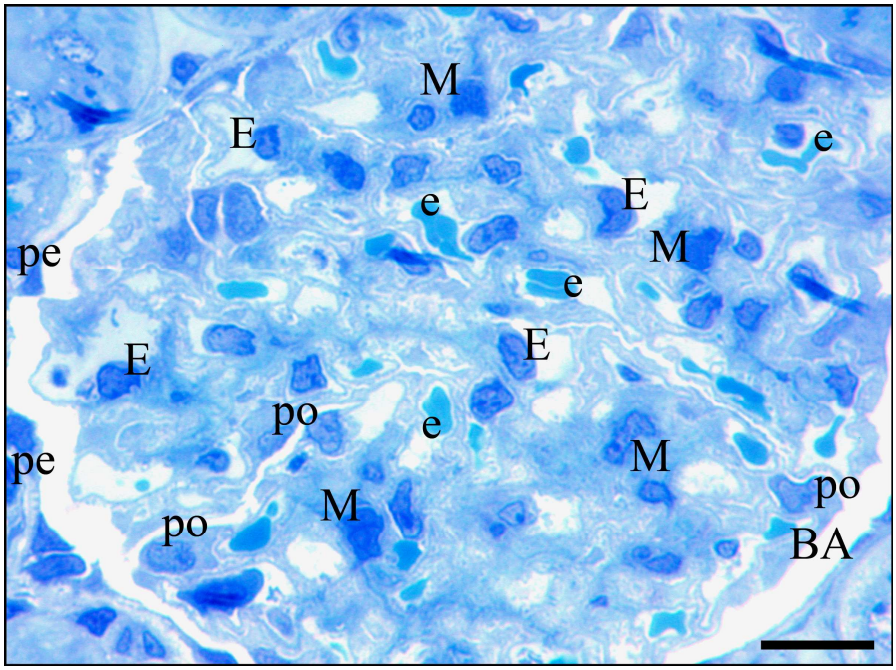
Şekil 4.2.5 A-B Kontrol grubu böbrek dokusu kesiti. Makula densa (ince ok), Bowman aralığı (BA), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d), damar lümeni (L) Gümüşleme Bar: 20 µm

Kontrol grubuna ait böbrek dokusunun frozen kesitlerinin Oil Red O ile boyanması sonucunda böbrek cisimciği, proksimal tübülüs ve distal tübülüslerde yağ inklüzyonları görülmedi (Şekil 4.2.6).



Şekil 4.2.6 Kontrol grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Bowman aralığı (BA), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d) Oil Red O Bar: 50 µm

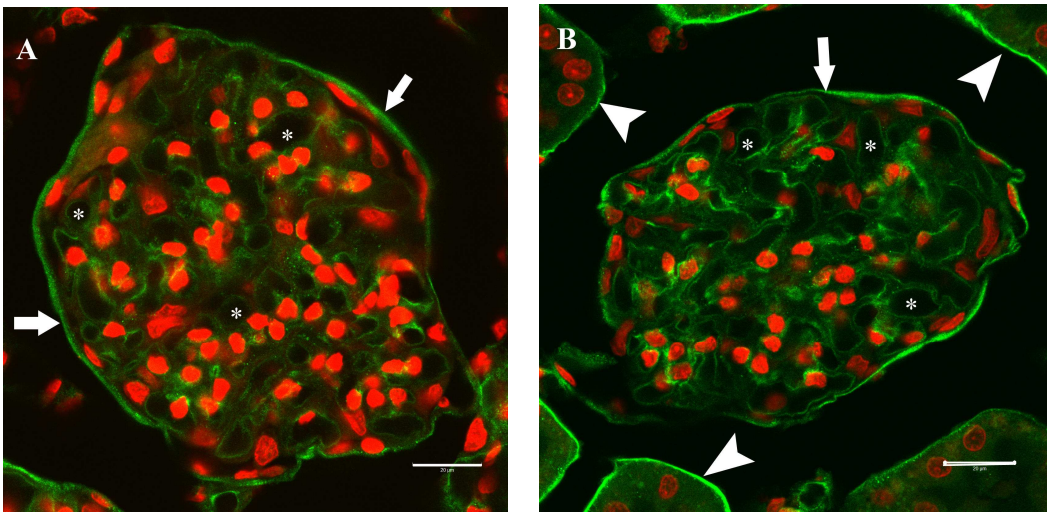
Kontrol grubuna ait böbrek dokusunun yarı ince kesitlerinde, böbrek cisimciğinin pariyetal yaprağının epitel hücreleri, visseral yaprağa ait podositler, glomerül endotel hücreleri ve glomerül içi mezangiyum hücreleri belirgin olarak ayırt edilebildi. Glomerül kılcal damar lümenleri normal görünümündeydi (Şekil 4.2.7).



Şekil 4.2.7. Kontrol grubu böbrek dokusu yarı ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), podosit (po), pariyetal epitel hücresi (pe), endotel (E), eritrosit (e), Bowman aralığı (BA) Toludin mavisi-Azur II Bar: 20 µm

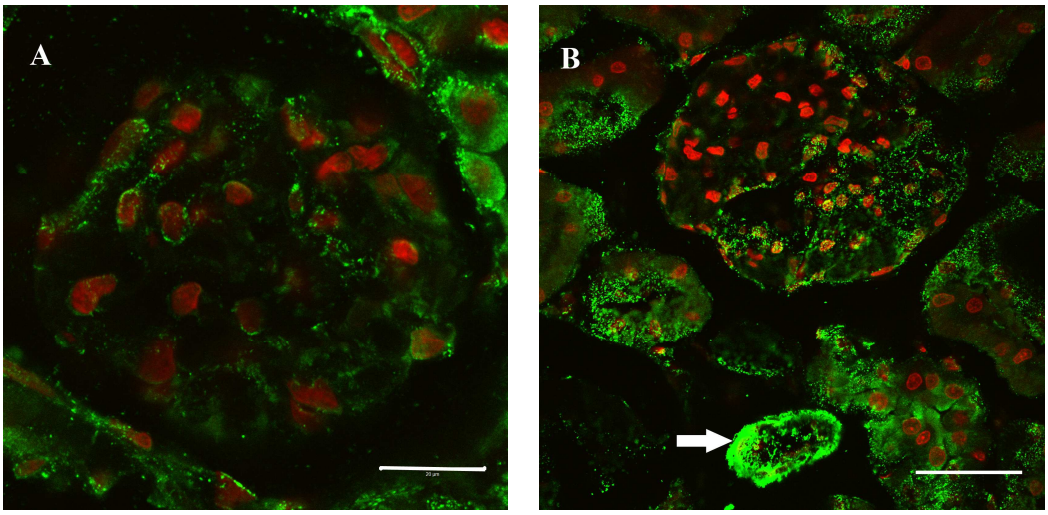
4.3. Kontrol Grubunun Konfokal Mikroskobik Bulguları

Kontrol grubu böbrek dokusu frozen kesitlerinde laminin ile immunfloresan boyamalarında glomerül kılcal damar bazal membranı ve pariyetal hücrelerine ait bazal membranlar pozitif boyandı. Mezangiyum bölgesinde lamininle pozitif sinyal alınmadı (Şekil 4.3.1 A-B).



Şekil 4.3.1 A-B. Kontrol grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Tübülüslere ait bazal membranlar (ok başı), Bowman kapsülü pariyetal yaprağı bazal membranı (ok), glomerül kılcal damar bazal membranı (asteriks). Laminin Bar: 20 µm

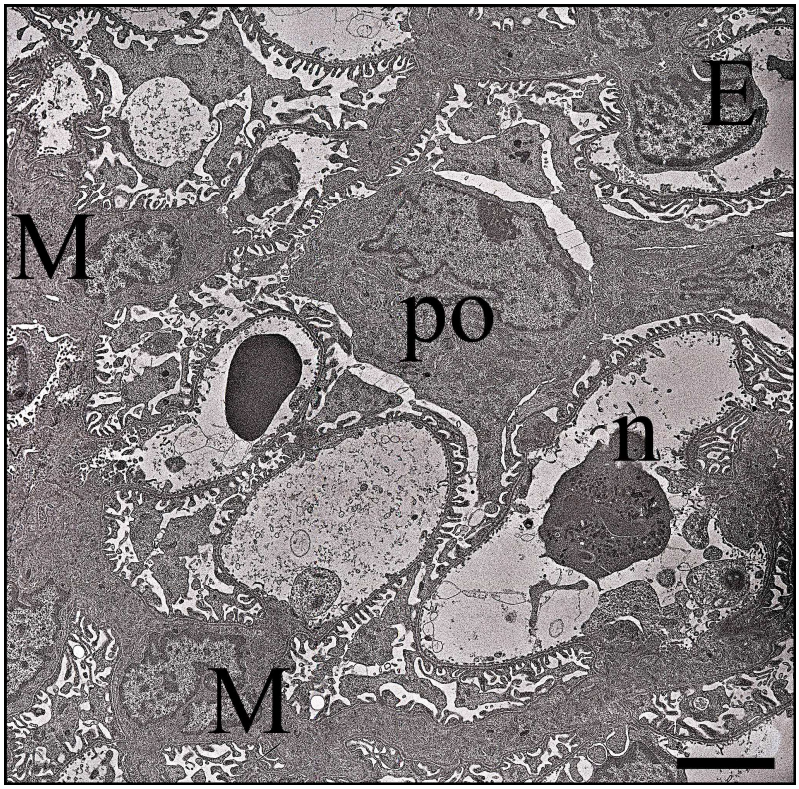
Kontrol grubu böbrek dokusu frozen kesitlerinde ASMA ile yapılan immunfloresan boyamalarında glomerül mezangiyumunda ASMA ya ait sinyal artışı gözlenmedi (Şekil 4.3.2 A-B).



Şekil 4.3.2 A-B Kontrol grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Mezangiyumda ASMA' ya ait sinyal izlenmedi. B: İnterstisiyumda kas tabakası ASMA pozitif damar (ok), pozitif kontrol. ASMA Bar: 20 µm

4.4. Kontrol Grubunun Elektron Mikroskobik Bulguları

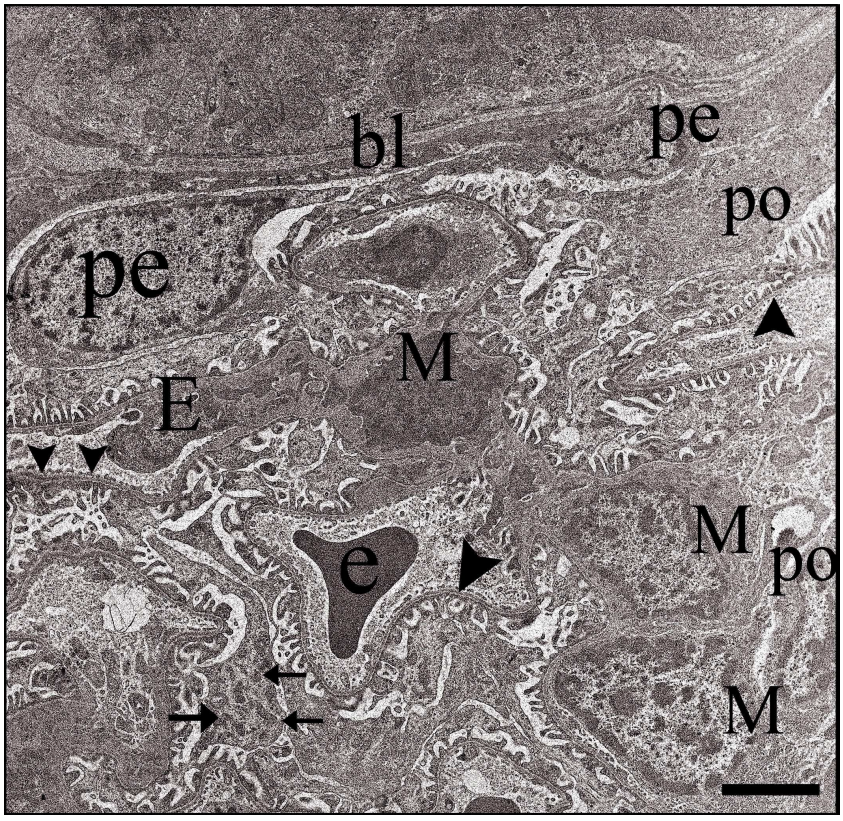
Kontrol grubuna ait böbrek cisimciğinin ince yapısında süzücü tabakayı oluşturan glomerül kılcal damar endoteli, Bowman kapsülünün visseral yaprağını oluşturan podosit hücreleri, podositlerin ayakçıkları ve kılcal damarlar arasında kesintisiz bir şekilde yer alan bazal lamina normal görünümleriyle tespit edildi. Glomerül kılcal damarlarının arasında büyük yuvarlak ya da oval çekirdekli mezangiyum hücreleri bulunuyordu. Glomerül kılcal damar lümenleri normal genişlikteydi ve içerisinde kan dokusuna ait hücrelere rastlandı (Şekil 4.4.1).



Şekil 4.4.1. Kontrol grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), podosit (po), endotel (E), nötrofil (n). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 5,6 µm

Kontrol grubuna ait böbrek cisimciğinin ince yapısında Bowman kapsülünün dış yaprağını oluşturan pariyetal epitel hücreleri, dış taraflarında ince bir bazal lamina üzerinde oturur şekilde gözlendi. Bowman kapsülünün visseral yaprağını oluşturan

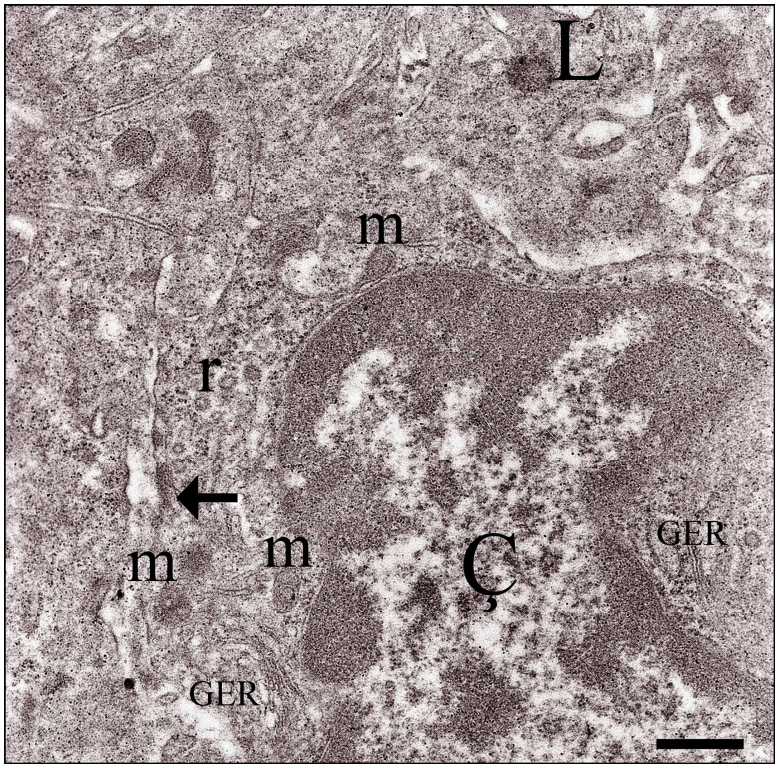
podositlerin ayakçıkları (pediseller) filtrasyon aralığını oluşturacak şekilde bazal lamina üzerine düzgün aralıklarla tutunuyorlardı. Podosit sitoplazmasında bol mitokondriyon varlığı izlendi. Glomerül kılcalları endoteli iyice ince tek katlı yassı epitel yapısındaydı. Endotel hücrelerinin düzgün aralıklarla seyreden pencereli (fenestralı) yapısı dikkati çekti (Şekil 4.4.2).



Şekil 4.4.2. Kontrol grubu böbrek dokusu ince kesiti. Bowman kapsülü bazal laminası (bl), pariyetal epitel hücresi (pe), mezangiyum hücresi (M), podosit (po), podosit hücresine ait mitokondriyonlar (ok), endotel (E), eritrosit (e), endotel hücresine ait fenestralar (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 4,34 µm

Kontrol grubuna ait glomerül kılcal damar ağı arasında mezangiyum matriksi içerisine gömülmüş olarak bulunan mezangiyum hücreleri büyük, düzensiz şekilli, kromatinden yoğun çekirdekleri ve organelden çok da zengin olmayan sitoplazmaları ile görüldü. Sitoplazmalarında düzgün kristalı mitokondriyonlar, rozet yapmış

ribozomlar, granüllü endoplazma retikulumu sarnıçları, mikrofilamanlar ve az sayıda lizozomlar bulunmaktaydı (Şekil 4.4.3).

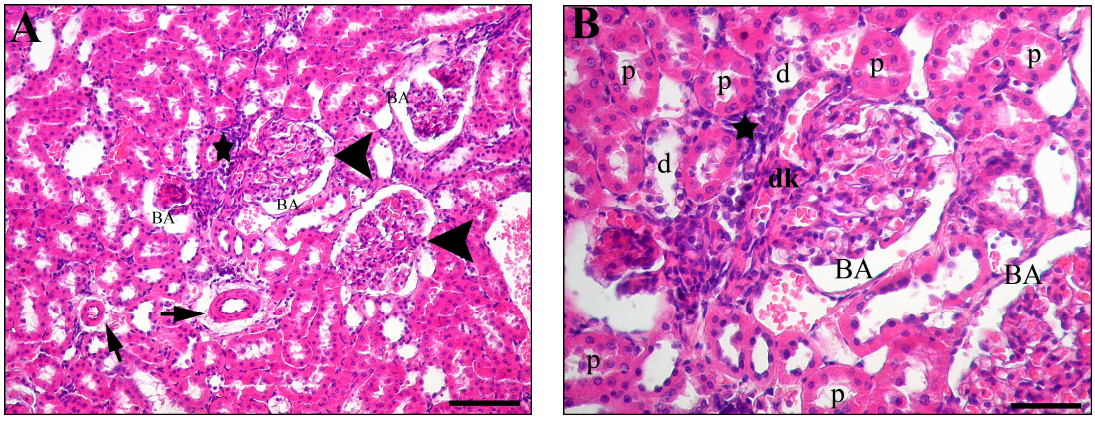


Şekil 4.4.3 Kontrol grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresine ait sitoplazmada gözlenen yapılar: çekirdek (Ç), mitokondriyon (m), rozet yapmış ribozomlar (r), granüllü endoplazma retikulumu (GER), mikrofilamanlar (ok), komşu mezangiyum hücresinde lizozom (L). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 0,56 µm

4.5. Deney Grubunun Işık Mikroskobik Bulguları

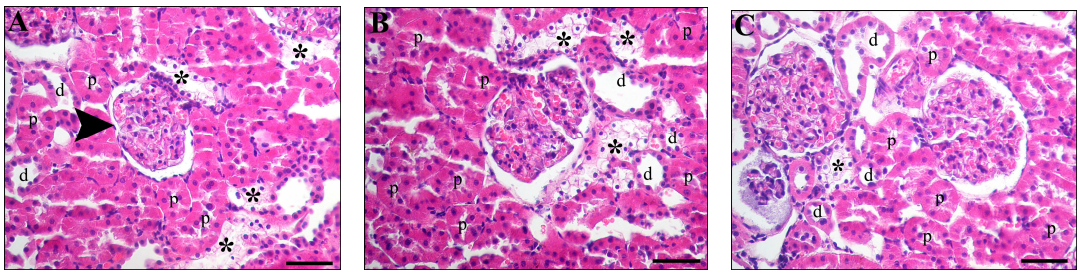
Deney grubuna ayrılan sıçan böbrek dokularının farklı boyalar kullanılarak incelenen kesitlerinde; böbrek cisimcikleri, proksimal ve distal tübülüsler, interstisiyel alan ve damarlar değerlendirildi. Hematoksilen-Eozin boyamalarında böbrek cisimciğini oluşturan Bowman kapsülü ve glomerül yumağı kontrol grubuna göre belirgin farklılık gösteriyordu. Bowman kapsülünün dış yaprağını oluşturan pariyetal epitel hücreleri ile visseral epitel hücreleri arasında bulunan Bowman aralığı genişlemiş görünümdeydi. Özellikle böbrek cisimciklerinin damar kutbuna

komşu olan interstisiyel bölgede, inflamatuvar hücrelerin artmış olduğu saptandı. İnterstisiyel alanda bulunan damarların çevresinde ödem mevcuttu (Şekil 4.5.1A-B).



Şekil 4.5.1 A-B Deney grubu böbrek dokusu kesiti. A: Farklı boyutlarda böbrek cisimcikleri (ok başı), genişlemiş Bowman aralığı (BA), damar kutbu bölgesinde inflamatuvar hücreler (yıldız), perivasküler ödem (ince ok). Hematoksilen Eozin Bar: 100 µm B: Damar kutbu (dk), genişlemiş Bowman aralığı (BA), damar kutbu bölgesinde inflamatuvar hücreler (yıldız), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d). Hematoksilen Eozin Bar: 50 µm

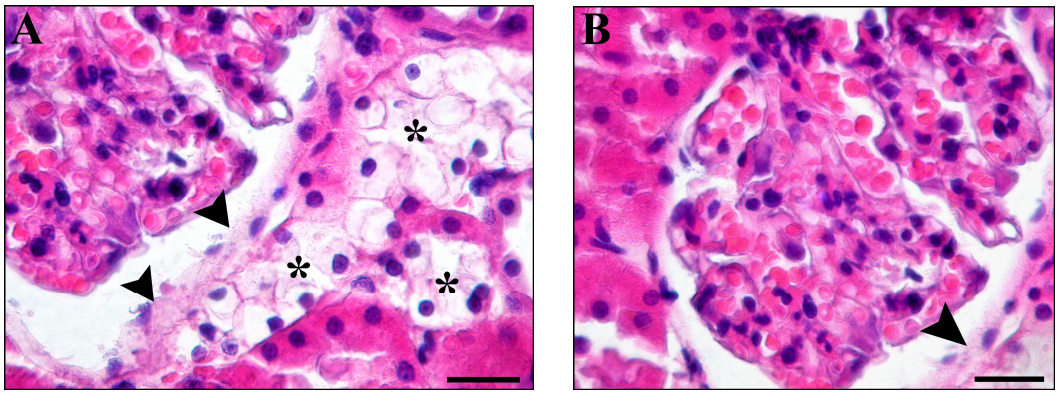
Deney grubu böbrek dokusu kesitlerinde böbrek cisimciğinin çevresinde bazı proksimal ve distal tübülüs kesitlerinde sitoplazma saydamlaşmış görünümdeydi (Şekil 4.5.2 A-C).



Şekil 4.5.2 A-C Deney grubu böbrek dokusu kesiti. A: Böbrek cisimciği (ok başı), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d), saydam sitoplazmalı tüp epitel hücreleri (asteriks). Hematoksilen Eozin Bar:50 µm, B: Saydam sitoplazmalı tüp

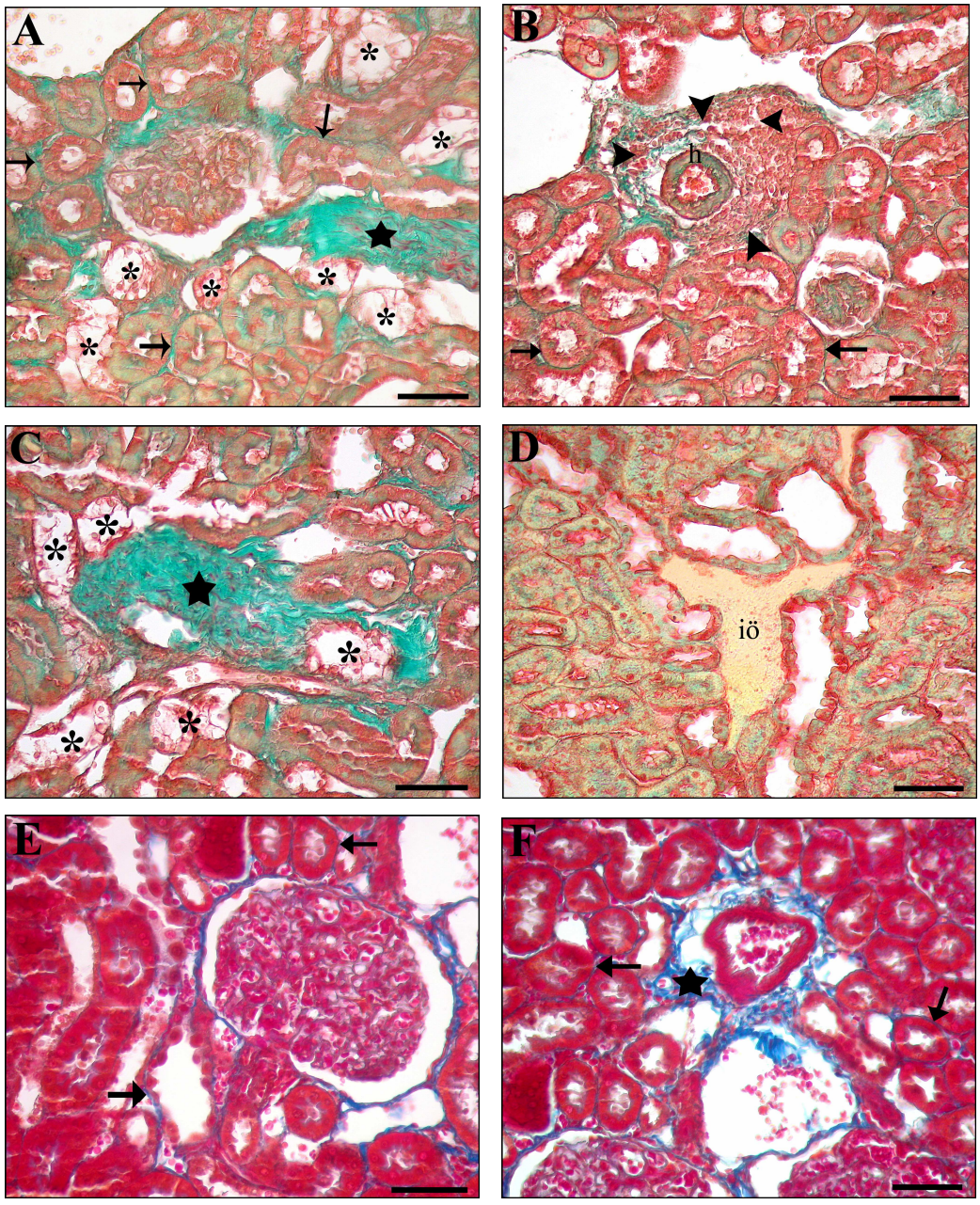
epitel hücreleri (asteriks), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d) Hematoksilen Eozin Bar: 50 µm, C: Saydam sitoplazmalı tüp epitel hücreleri (asteriks), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d) Hematoksilen Eozin Bar: 50 µm

Saydam görünümlü tübülüs epitel hücrelerinde çekirdekler orta duruşunu kaybetmiş bazal yerleşim gösteren yapılarıyla dikkati çekti. Deney grubu böbrek dokusu kesitlerinde böbrek cisimciğinin çevresindeki pariyetal epitel hücreleri hipertrofik görünümleriyle izlendi. Glomerül yumağını oluşturan hücrelerde belirgin artış gözlendi (Şekil 4.5.3 A-B).



Şekil 4.5.3 A-B Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Hipertrofik pariyetal epitel hücreleri (ok başı), saydam sitoplazmalı tübülüs epitel hücreleri (asteriks). Hematoksilen Eozin Bar: 20 µm

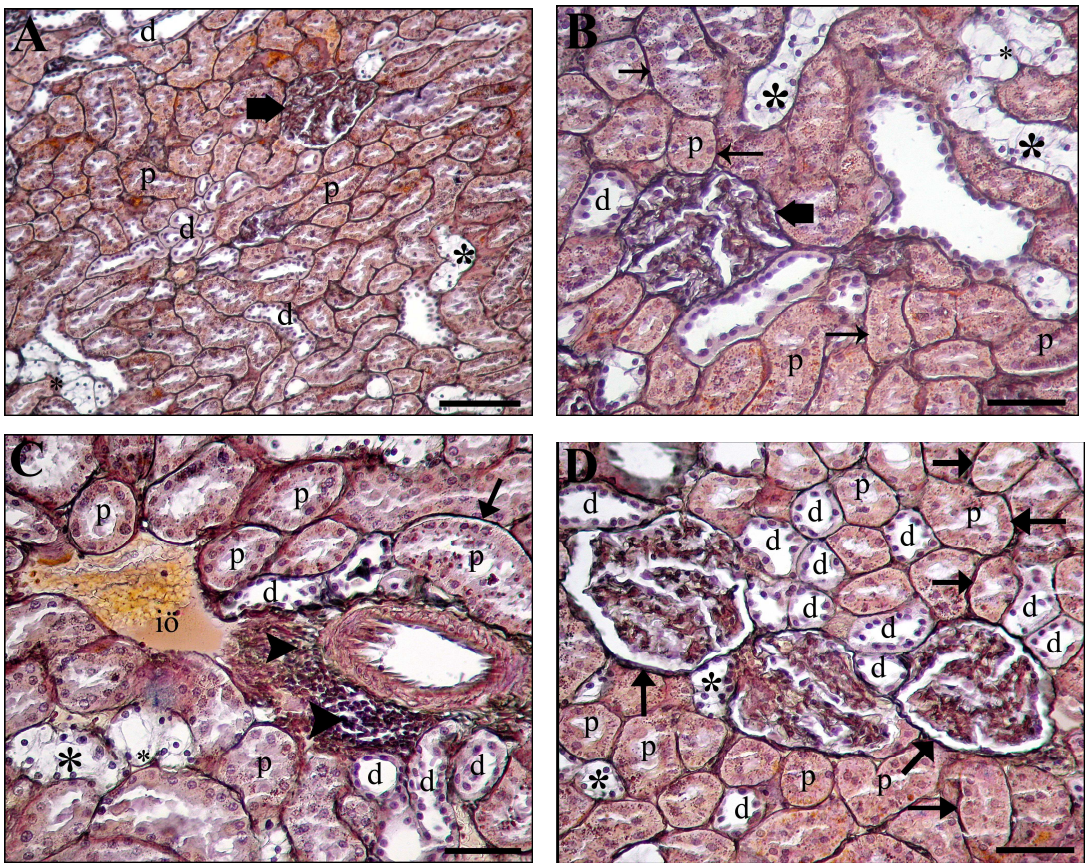
Deney grubu böbrek dokusu kesitlerinde bağ dokusu liflerine yönelik yapılan boyamalarda interstisiyumda belirgin fibrozis, tüplere ait bazal membranda ve pariyetal epitel hücrelerinin bazal membranlarında kalınlaşma gözlendi. Tübülüs epitel hücreleri sitoplazmasında görülen saydamlık bu boya ile de izlendi. İnterstisiyumda bulunan küçük çaplı damarların duvarında kas tabakası bulunması gereken alanda kollajen artışına bağlı hiyalinozis saptandı. Yine bu damarların çevresinde interstisiyel bölgede inflamatuvar hücre miktarında belirgin şekilde artış olduğu belirlendi. İnterstisiyel bölgede proksimal ve distal tüp kesitlerini birbirinden uzaklaştıracak ölçüde ödem gelişmişti (Şekil 4.5.4 A-F).



Şekil 4.5.4 A-F Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Fibrozis (yıldız), tüp bazal membranlarında kalınlaşma (ok), saydam sitoplazmalı tübülüs epitel hücreleri (asteriks), interstisiyel bölgede inflamatuvar hücreler (ok başı), damar duvarında hiyalinozis (h), interstisiyel alanda ödem (iö). A-D: Masson'un trikrom boyası Bar: 50 µm E-F: Mallory-Azan Bar: 50 µm

Deney grubu böbrek dokusu kesitlerinde gümüşleme impregnasyon tekniği ile retikulum liflerinin bulunduğu bölgeler olan; tübülüs bazal membranları, böbrek

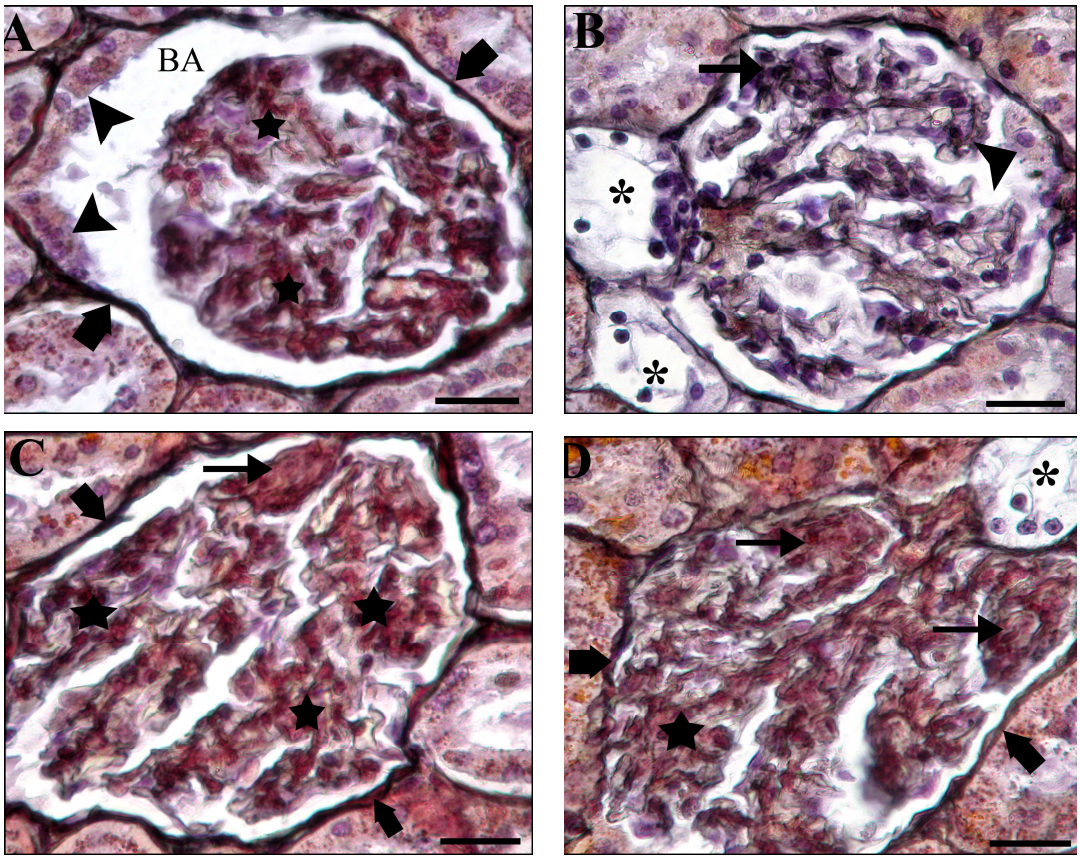
cisimciklerinin pariyetal epitel bazal membranları, glomerül bazal membranları kesin hatları ile kalınlaşmış olarak gözlendi. Bu boyama yönteminde proksimal ve distal tübülüsler birbirinden kolayca ayırt ediliyordu. Proksimal ve distal tübülüs epitel hücrelerinde saydam görünüm bu boya ile de saptandı. İnterstisiyel bölgede damarların çevresinde fibrozis, inflamatuvar hücreler ve ödem mevcuttu (Şekil 4.5.5 A-D).



Şekil 4.5.5 A-D Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Böbrek cisimciği (kalın ok), tüm bazal membranlarda kalınlaşma (ok), saydam sitoplazmalı tübülüs epitel hücreleri (asteriks), interstisiyel bölgede inflamatuvar hücreler (ok başı), interstisiyel alanda ödem (iö), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d). Metamin gümüşleme, A: Bar: 100 µm, B-D: Bar: 50 µm

Deney grubu böbrek dokusu gümüşleme impregnasyon tekniği ile boyanan böbrek cisimciği kesitlerinin tümünde, pariyetal epitel hücrelerine ait bazal membran

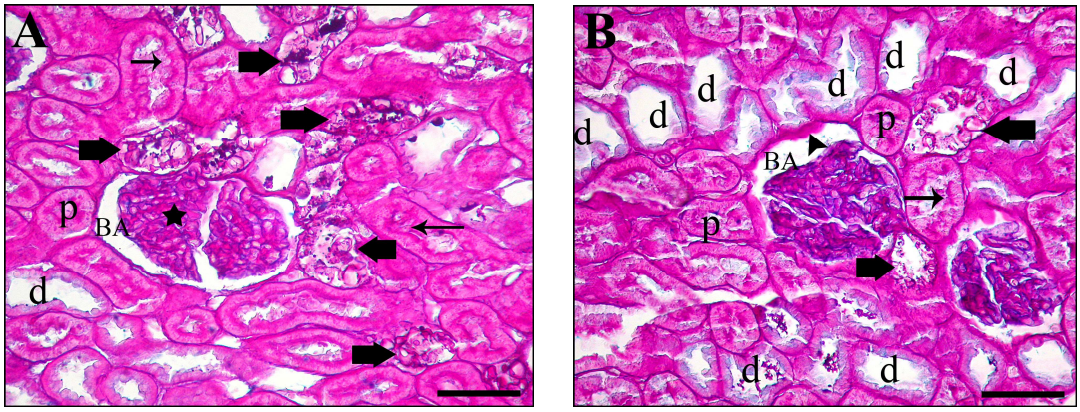
ve glomerül bazal membranları kalınlaşmış yapıdaydı. Pariyetal epitel hücrelerinde belirgin hipertrofi ve Bowman aralığında genişleme görüldü. Glomerül kılcal damar lümenlerindeki obliterasyon nedeniyle yer yer kollabe olmuş damarlar fark edildi. Mezangiyumda sıklıkla diffuz yer yer de nodüler şekilde gelişen glomerüloskleroz gümüşleme yönteminde daha belirgin boyanmış olarak ayırt edilebildi (Şekil 4.5.6 A-D).



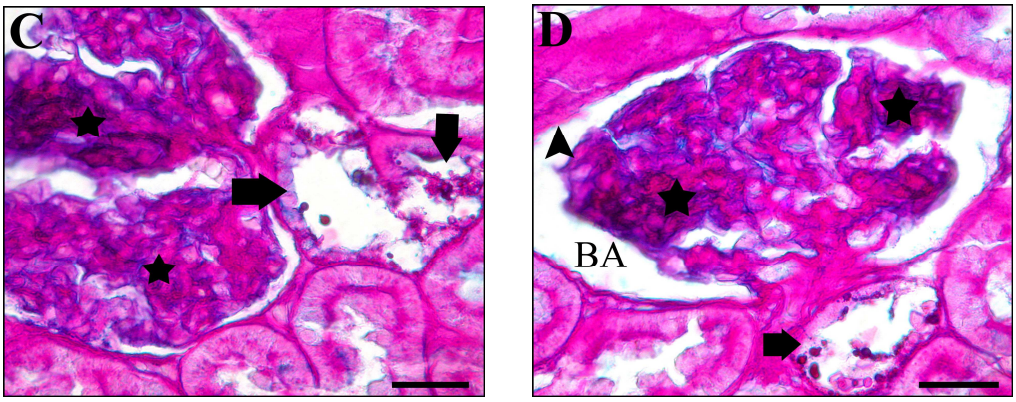
Şekil 4.5.6 A-D Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Bazal membranlarda kalınlaşma (kalın ok), pariyetal epitel hücrelerinde hipertrofi (ok başı), Bowman aralığı (BA), nodüler glomerüloskleroz (ince ok), diffuz glomerüloskleroz (yıldız), saydam sitoplazmalı tübülüs epitel hücreleri (asteriks), Metamin gümüşleme, A-D, Bar: 20 µm

Periyodik asit Schiff reaksiyonu ve alsiyan mavisi-PAS boyamaları uygulanan deney grubu böbrek dokusu kesitlerinde proksimal tübülüs epitel hücrelerinin apikal yüzlerindeki fırçamsı kenar yapısı kontrol grubundan farklı olarak devamlılığını

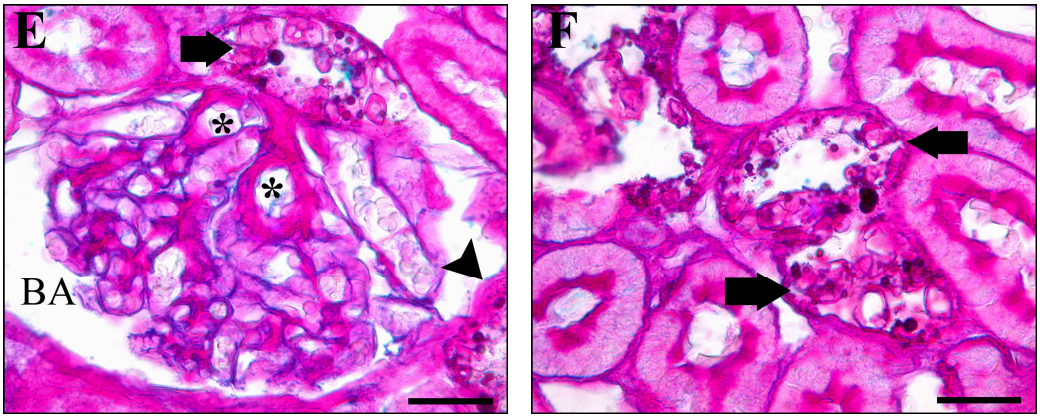
kaybetmişti. Bazı proksimal ve distal tübülüs epitel hücrelerinde çarpıcı görünümde dejeneratif değişiklikler izlendi. Epitel hücrelerinin sitoplazmalarındaki bu değişikliklerin PAS yöntemiyle daha belirgin boyanması, bu yapıların sitoplazmada biriken glikojen varlığına bağlı olduğunu düşündürdü. Birçok böbrek cisimciğinin glomerül mezangiyumunda genişleme ve bu genişlemeye sekonder kılcal damar lümenlerinde obliterasyon görüldü. Bazı böbrek cisimciklerinin damar kutbu bölgelerinde arteriyol duvarında hiyalin materyalinin birikimine bağlı olarak kalınlaşma dikkati çekti. Bu boyama yöntemiyle diğer boyamalarda da görülen Bowman aralığında genişleme ve pariyetal epitel hücrelerine ait bazal membranda kalınlaşma belirgin şekilde gözlendi (Şekil 4.5.7 A-F, Şekil 4.5.8 A-B).



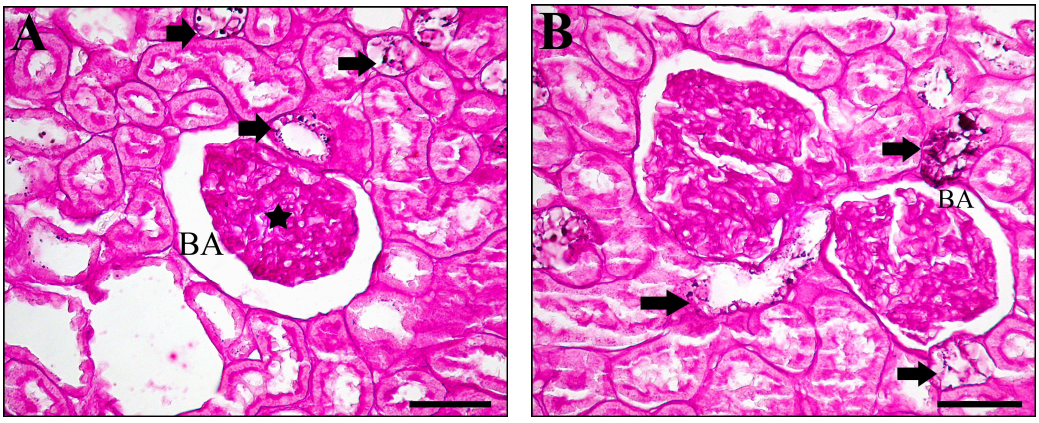
Şekil 4.5.7 A-B Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Bowman membranında kalınlaşma (ok başı), Bowman aralığı (BA), mezangiyumda sklerotik değişiklikler (yıldız), dejeneratif değişiklikler gösteren tübülüsler (kalın ok), proksimal tübülüs fırçamsı kenarının devamlılığında bozulma (ince ok), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d). Alsiyan mavisi-PAS, A-B, Bar: 50 µm



Şekil 4.5.7 C-D Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Bowman membranında kalınlaşma (ok başı), Bowman aralığı (BA), mezangiyumda sklerotik değişiklikler (yıldız), dejeneratif değişiklikler gösteren tübülüsler (kalın ok). Alsiyan mavisi-PAS, Bar: 20 µm

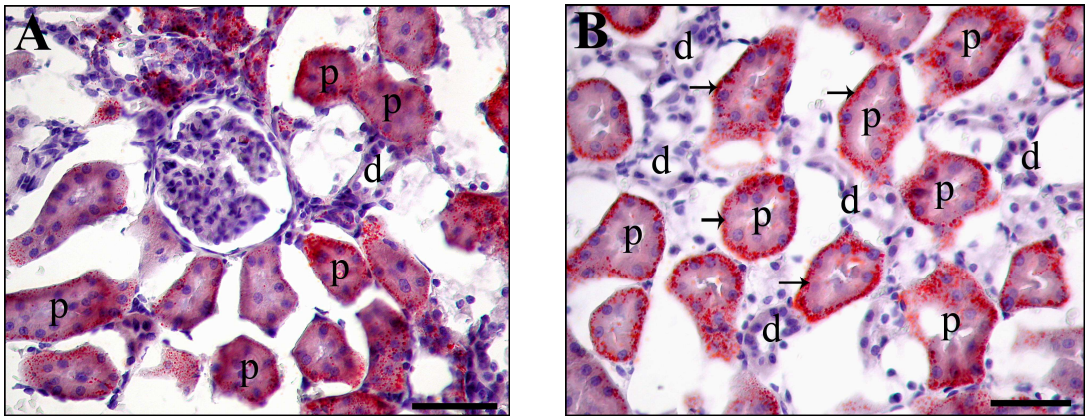


Şekil 4.5.7 E-F Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Bowman membranında kalınlaşma (ok başı), Bowman aralığı (BA), dejeneratif değişiklikler gösteren tübülüsler (kalın ok), glomerül damar duvarında kalınlaşma (asteriks). Alsiyan mavisi-PAS, Bar: 20 µm

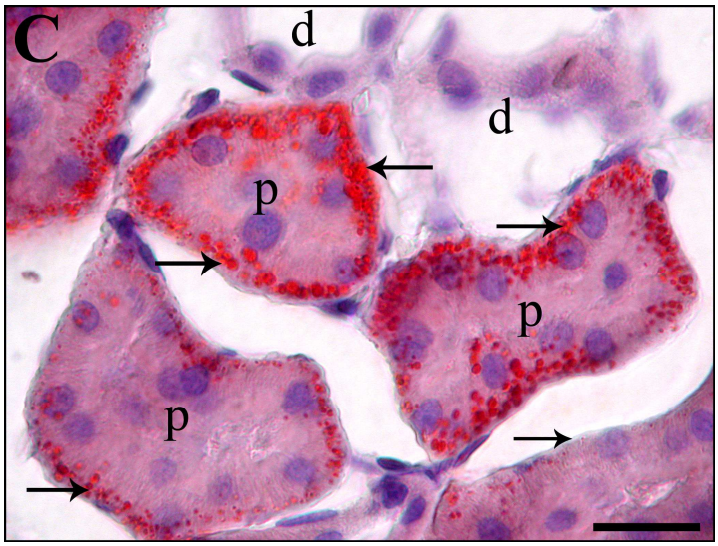


Şekil 4.5.8 A-B Deney grubu böbrek dokusu kesiti. Bowman aralığı (BA), mezangiyumda sklerotik değişiklikler (yıldız), dejeneratif değişiklikler gösteren tübülüsler (ok). PAS, A-B Bar: 50 µm

Rutin histolojik takip ve boyama işlemleriyle incelenen deney grubu böbrek dokusu tübülüs epitel hücrelerindeki saydam görülen yapıların, yağ inklüzyonları olup olmadığını belirlemek amacıyla, nötral lipidlere özgün bir boya olan oil red O boyası böbrek frozen kesitlerine uygulandı. Bu frozen kesitlerde sadece proksimal tüp epitel hücrelerinin sitoplazmalarının özellikle bazal bölümünde mitokondriyonların yoğun olduğu bölgelerde, yuvarlak, düzgün sınırlı yağ damlacıkları kırmızı renkte boyanmış olarak görüldü. Bowman cisimciğini oluşturan yapılarda ve distal tübülüslerde boyanma varlığı görülmedi (Şekil 4.5.9. A-C).

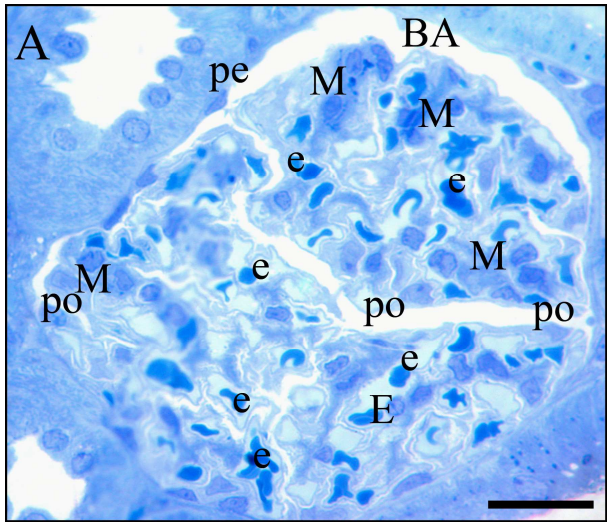


Şekil 4.5.9 A-B Deney grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Kırmızı boyanan yağ damlacıkları (ok), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d). Oil red O Bar: 50 µm

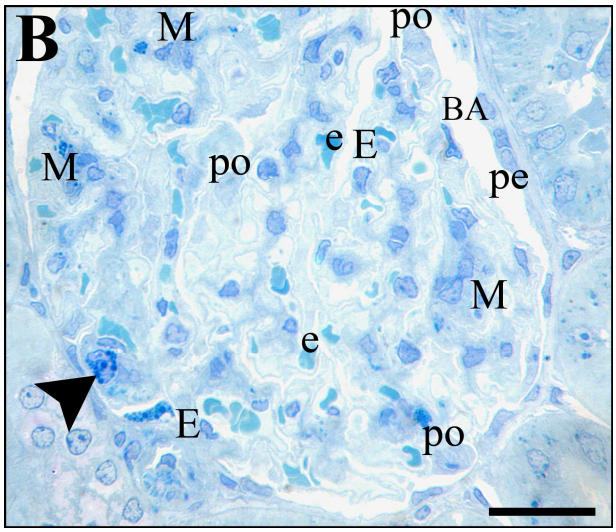


Şekil 4.5.9 C Deney grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Kırmızı boyanan yağ damlacıkları (ok), proksimal tübülüs (p), distal tübülüs (d). Oil red O Bar: 20 µm

Deney grubuna ait böbrek dokusunun yarı ince kesitleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında böbrek cisimciğinin pariyetal yaprağının epitel hücreleri daha iri ve kaba şekilleri, glomerül içi mezangiyum hücreleri ise sayıca artmış görünümleri ile dikkati çekti. Bowman boşluğunda, damar kutbunda glomerül yumağının başlangıcında bulunan, pariyetal epitel hücrelerinin bazal membranı üzerine oturan sitoplazmalarında çok sayıda granüller içeren peripolar hücreler görüldü. Glomerül kılcal damar lümenlerinde obliterasyon belirgin şekilde izlendi (Şekil 4.5.10 A-B).



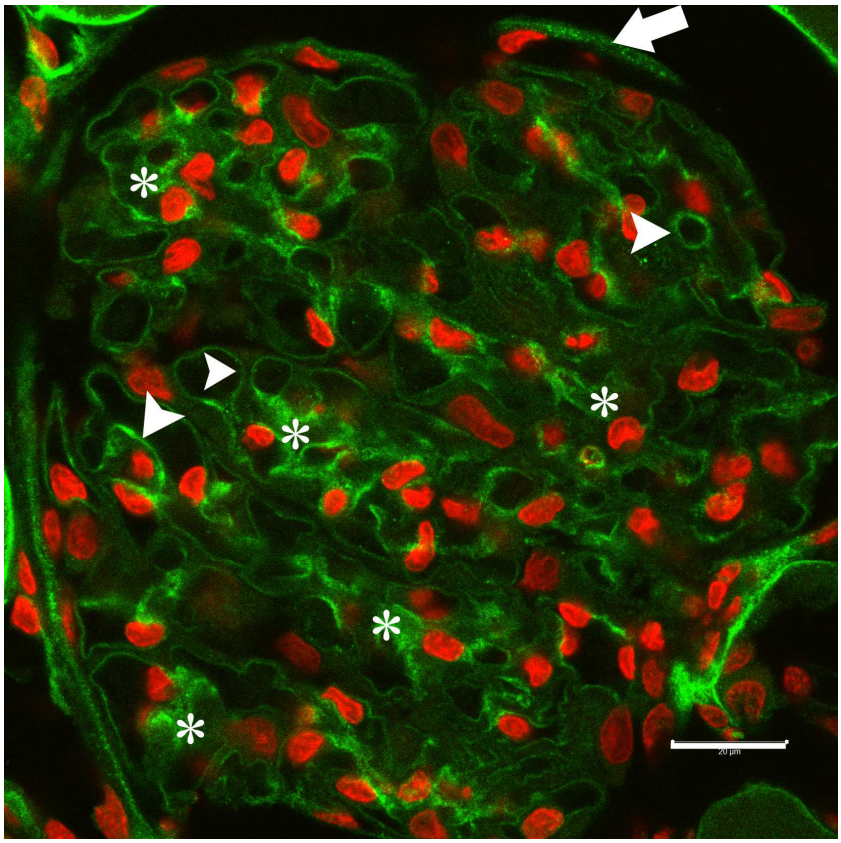
Şekil 4.5.10 A Deney grubu böbrek dokusu yarı ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), podosit (po), pariyetal epitel hücresi (pe), endotel (E), eritrosit (e), Bowman aralığı (BA). Toludin mavisi-Azur II Bar: 20 µm



Şekil 4.5.10 B Deney grubu böbrek dokusu yarı ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), podosit (po), pariyetal epitel hücresi (pe), endotel (E), eritrosit (e), Bowman aralığı (BA), peripolar hücre (ok başı). Toludin mavisi-Azur II Bar: 20 µm

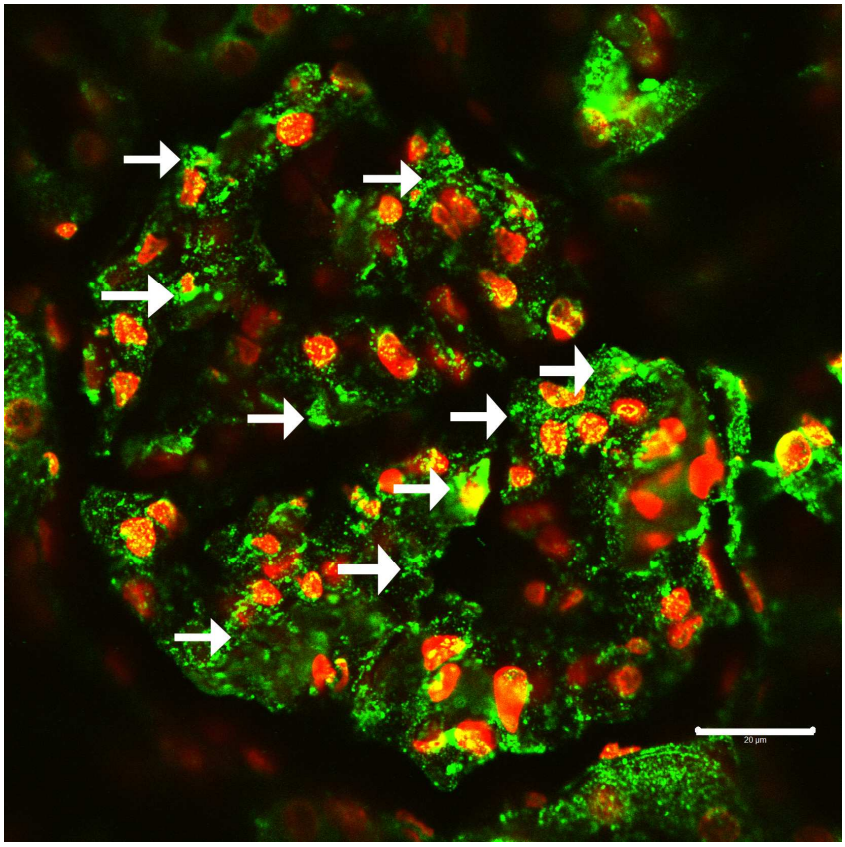
4.6. Deney Grubunun Konfokal Mikroskobik Bulguları

Deney grubu böbrek dokusu frozen kesitlerinin laminin ile immunfloresan boyamalarında glomerül kılcal damar bazal membranı ve pariyetal epitel hücrelerine ait bazal membranları kuvvetli pozitif boyandı. Özellikle kontrol grubunun aksine mezangiyum bölgesinde lamininin artmış belirgin pozitif sinyali dikkati çekti (Şekil 4.6.1).



Şekil 4.6.1 Deney grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Bowman kapsülü pariyetal yaprağı bazal membranı (ok), glomerül kılcal damar bazal membranı (ok başı), mezangiyumda laminine ait sinyal artışı (asteriks). Laminin, Bar: 20 µm

Deney grubu böbrek dokusu frozen kesitlerinde ASMA ile yapılan immunfloresan boyamalarında glomerül mezangiyumunda ASMA'ya ait sinyal artışı pozitif saptandı (Şekil 4.6.2).



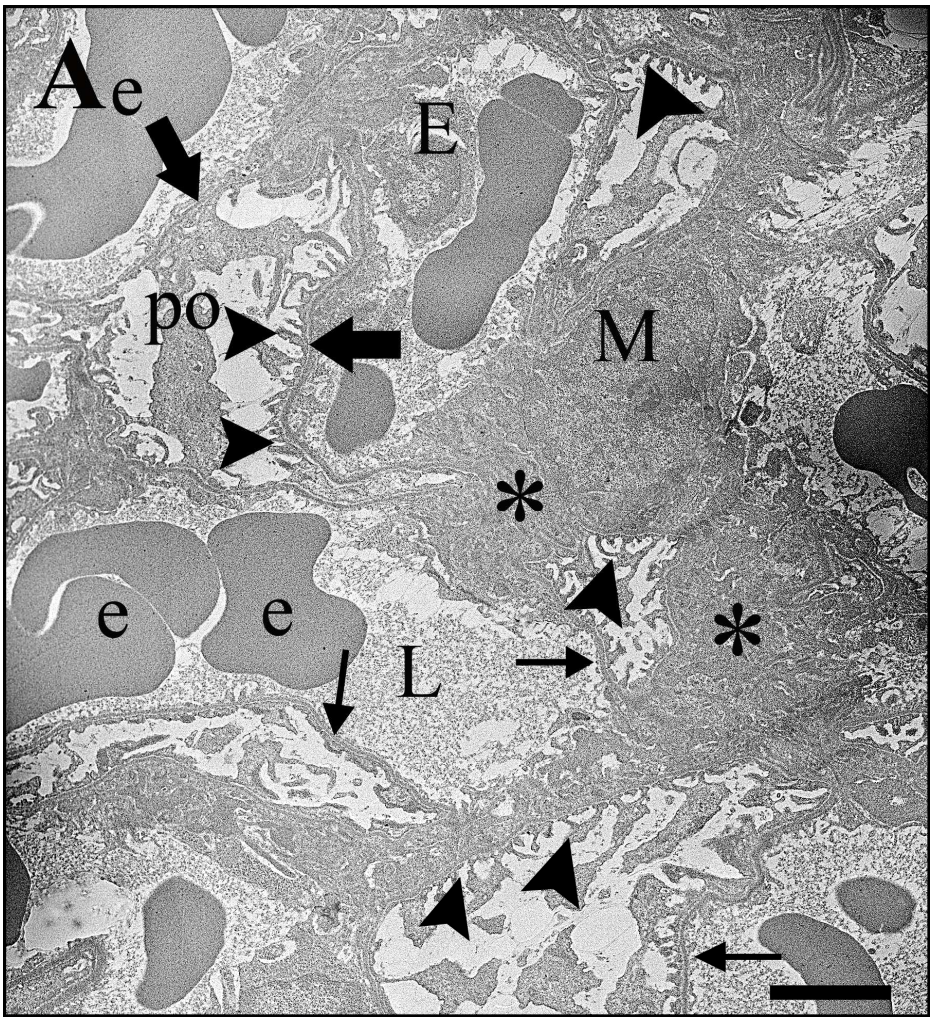
Şekil 4.6.2 Deney grubu böbrek dokusu frozen kesiti. Mezangiyumda ASMA pozitif alanlar (ok). ASMA, Bar: 20 µm

4.7. Deney Grubunun Elektron Mikroskobik Bulguları

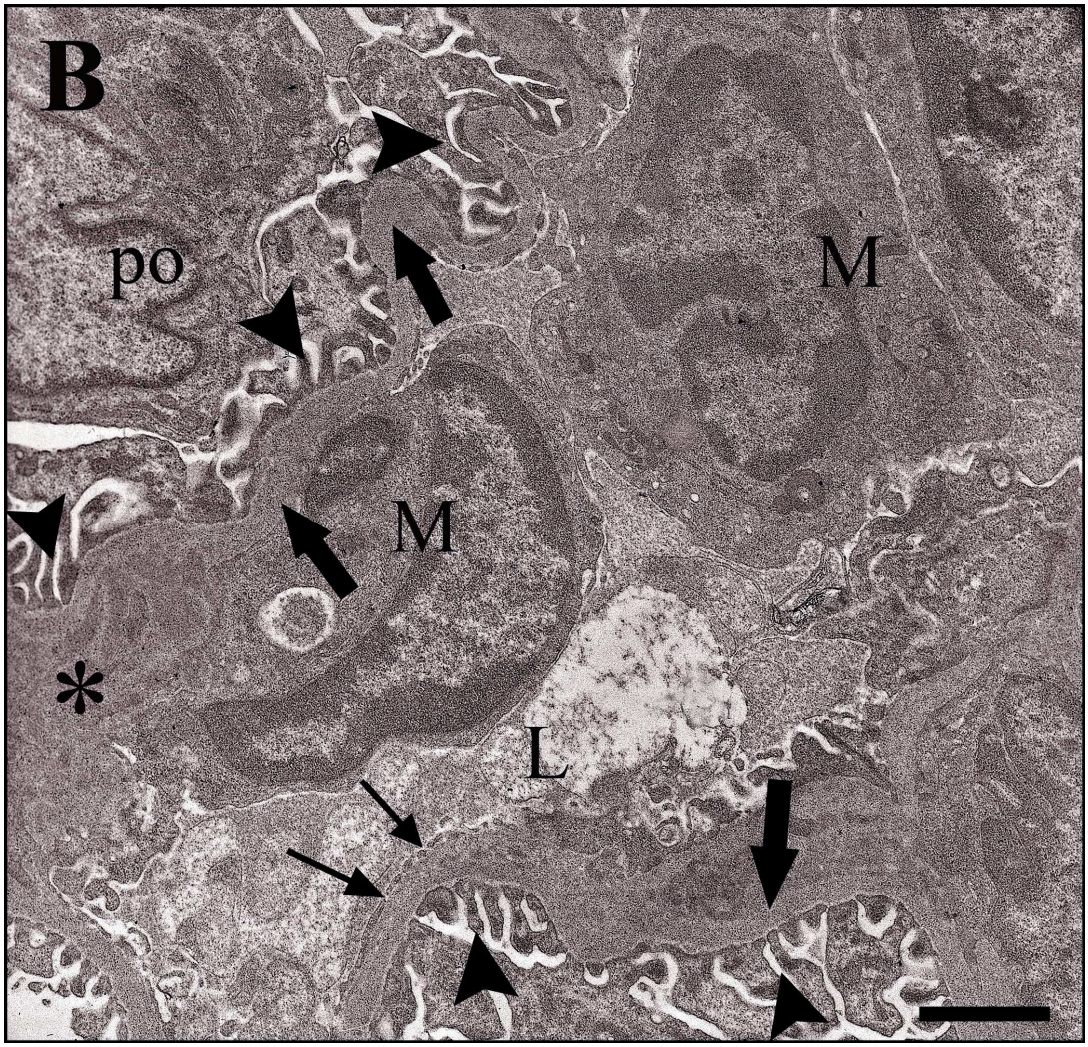
Böbrek dokusu ince kesitlerinde özellikle mezangiyum hücrelerinin bulunduğu bölge olan glomerül yumakları değerlendirildi. Glomerül kılcalları arasında, lümenleri geniş ve içleri eritrositlerle dolu olanların yanı sıra iyice daralmış lümen görünümlerine de rastlandı. Endotel hücrelerinin fenastralarında kapanmalar ve düzensizlikler gözlendi. Glomerül bazal laminası kalınlaşmıştı ve yer yer kıvrıntılı yapısıyla dikkati çekti. Podosit hücrelerinin ayakçıklarında saçaklı şekilde parçalanmış görünüm veren dejenerasyon bulguları ve bazı bölgelerde de ayakçıklarda kaynaşma izlendi (Şekil 4.7.1 A-B).

Mezangiyum hücreleri heterokromatin yapıda oval şekilli çekirdekleri ve yoğun sitoplazma organalleri ile dikkati çekti. Mezangiyum hücrelerinin çevresinde

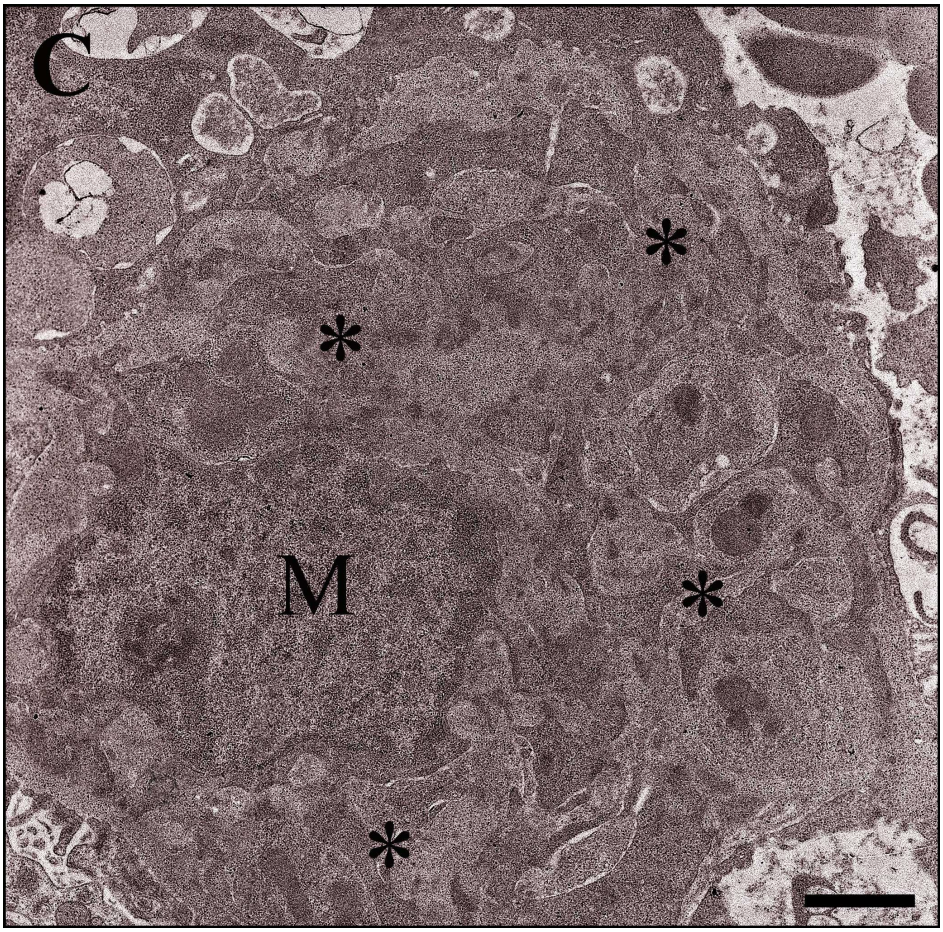
mezangiyum matriksi elektron yoğun görünümlüydü. Glomerül mezangiyumunda genişlemeye neden olan ekstrasellüler matriks artışı, amorf veya granüler görünümüyle glomerülosklerozun varlığına işaret ediyordu (Şekil 4.7.1 B-C).



Şekil 4.7.1 A Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), kılcal damar lümeni (L), podosit hücresi (po), podosit ayakçıkları (ok başı), ortak bazal lamina (kalın ok), endotel hücresi (E), endotel hücrelerine ait fenestralar (ince ok), eritrositler (e), elektron yoğun mezangiyum matriksi (asteriks). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 3,36 µm

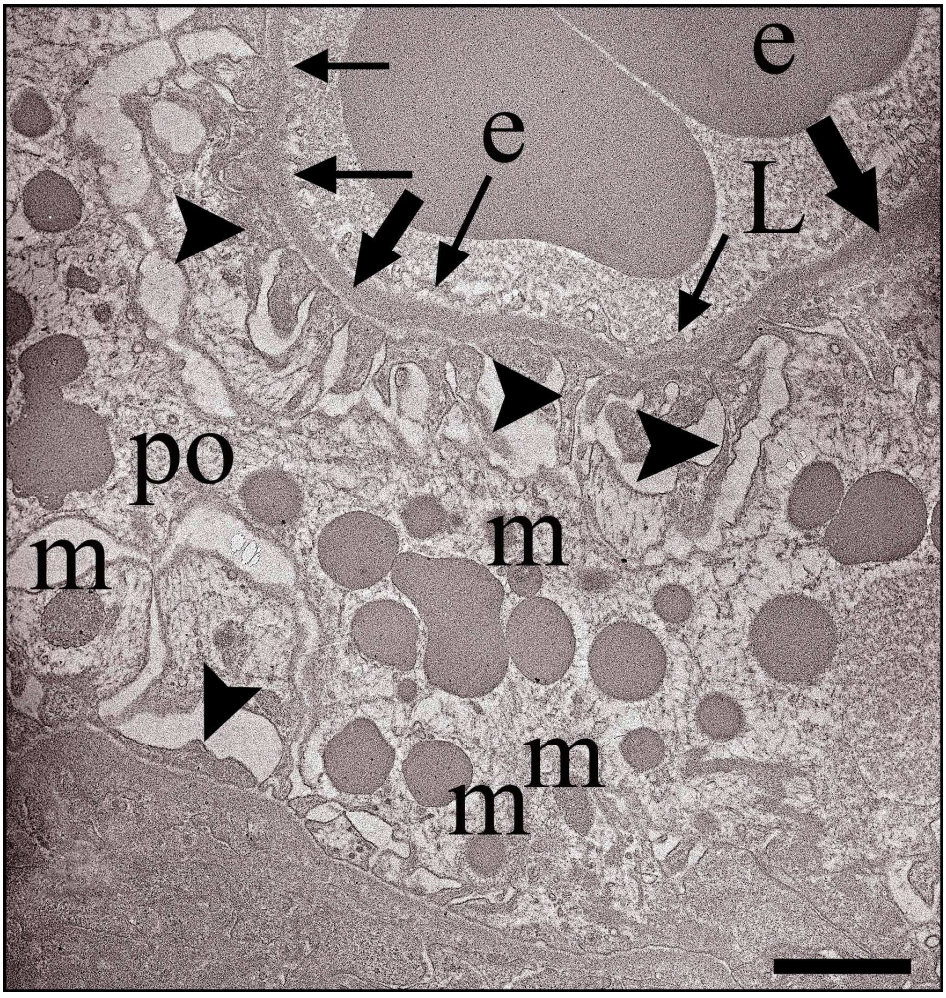


Şekil 4.7.1 B Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), kılcal damar lümeni (L), podosit hücresi (po), podosit ayakçıkları (ok başı), ortak bazal lamina (kalın ok), endotel hücrelerine ait fenestralar (ince ok), elektron yoğun mezangiyum matriksi (asteriks). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 2,01 µm



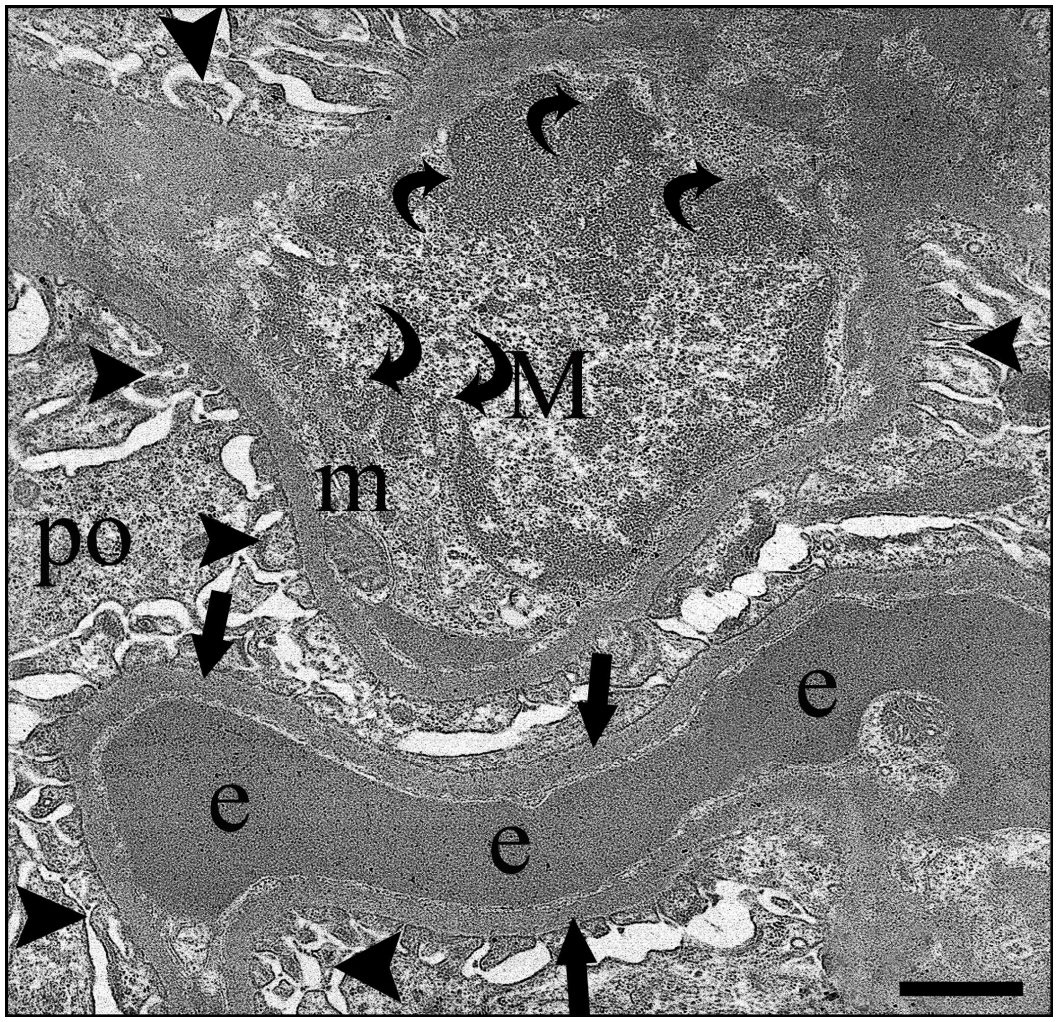
Şekil 4.7.1. C Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi (M), elektron yoğun mezangiyum matriksi (asteriks). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 2,01 µm

Visseral yaprağı oluşturan podositlerin sitoplazmasında normalden çok büyük ve dens görünümlü mitokondriyonlar mevcuttu. Sitoplazma mikrofilamanlardan zengin görünümüyle dikkati çekti (Şekil 4.7.2).



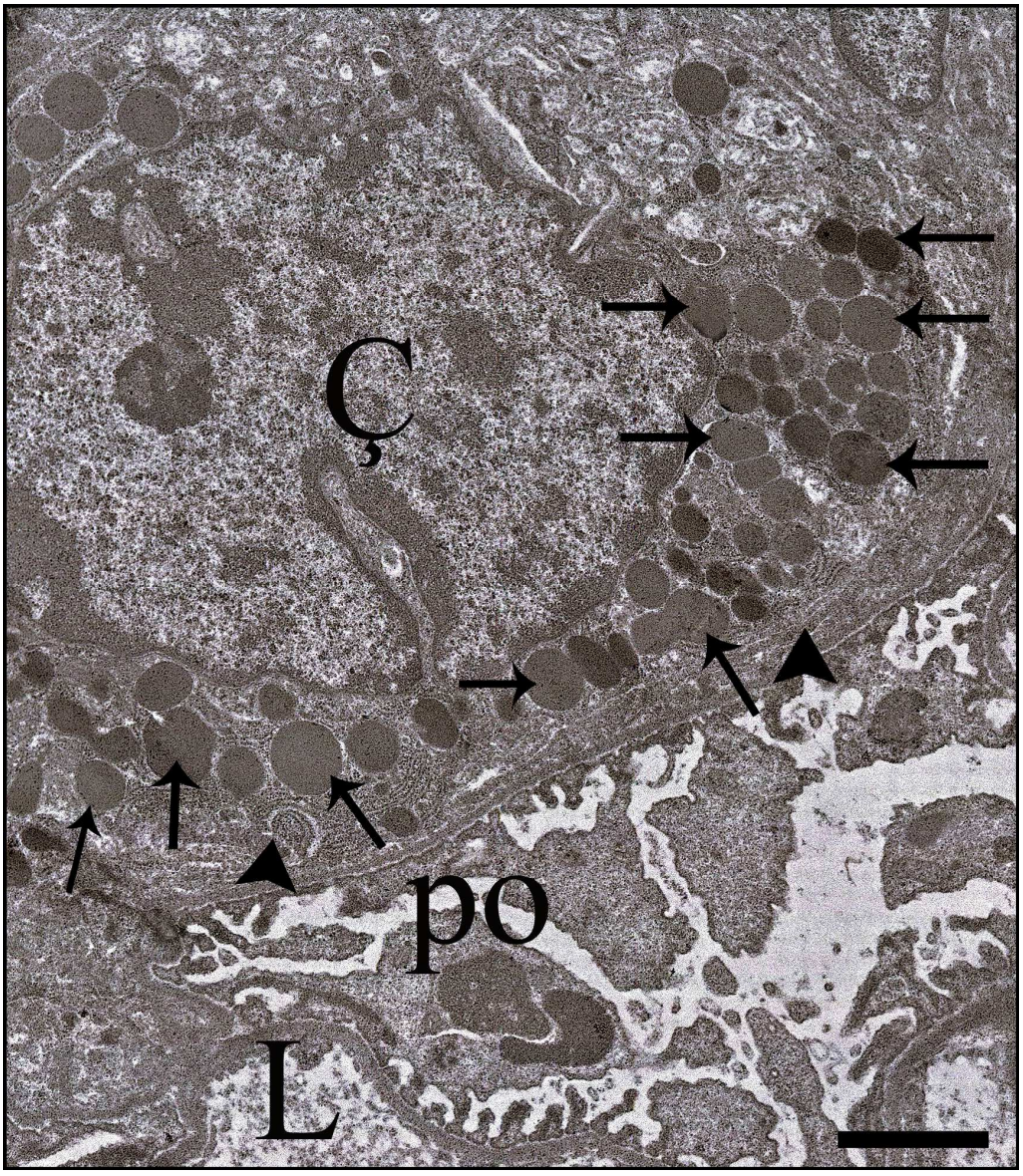
Şekil 4.7.2 Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Kılcal damar lümeni (L), podosit hücresi (po), podosit ayakçıkları (ok başı), ortak bazal lamina (kalın ok), endotel hücrelerine ait fenestralar (ince ok), mitokondriyonlar (m). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 2,01 µm

Kaynaşmış podosit ayakçıklarının oturduğu bazal laminada homojen kalınlaşma vardı. Glomerül kılcal damar lümeni daralmış ve eritrositler tarafından doldurulmuştu. Endotel hücrelerinin fenestraları düzgün şekilde yer almadığından takip edilemiyordu. Mezangiyum hücresinin çekirdek zarı çekirdek matriksi içerisine doğru girintiler yapmıştı. Çekirdeğin bu kontrakte görünümü hücre sitoplazmasında yoğun olarak bulunduğu bilinen miyozin benzeri kontraktil filamanların varlığına bağlandı. Sitoplazma içerisinde bol olarak bulunan ince filamanlar özellikle hücre zarına yakın bölgelerde yoğun plaklar yapacak şekilde yerleşmişti (Şekil 4.7.3).



Şekil 4.7.3 Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresinin çekirdeği (M), eritrositler (e), podosit hücresi (po), podosit ayakçıkları (ok başı), ortak bazal lamina (kalın ok), çekirdek zarında girintiler (kıvrık ok), mitokondriyon (m). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 1,56 µm

Visseral yaprağı oluşturan podositlerle pariyetal yapraktaki yassı epitel hücreleri arasında peripolar hücreler görüldü. Bu hücrelerin pariyetal epitel hücrelerinin bazal membranı üzerine oturarak apikal yüzleri ile Bowman boşluğuna baktıkları belirlendi. Peripolar hücrelerin sitoplazmasında elektron mikroskobunda koyu renkte gözlenen çok sayıda farklı sentez aşamasında olan salgı granülü bulunuyordu (Şekil 4.7.4).

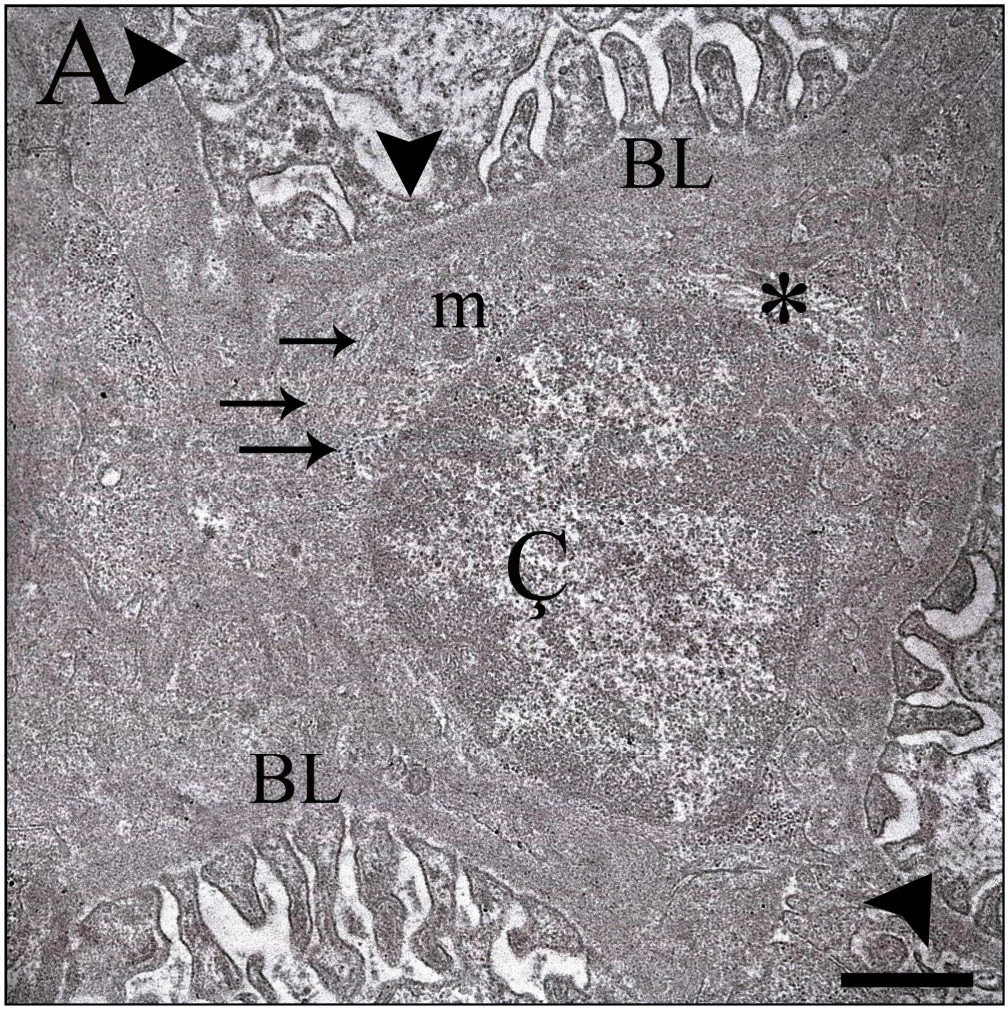


Şekil 4.7.4 Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Peripolar hücresinin çekirdeği (Ç), podosit hücresi (po), sitoplazma içerisinde salgı granülleri (ok), granüllü endoplazma retikulumu (ok başı), glomerül kılcal damar lümeni (L). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 1,56 µm

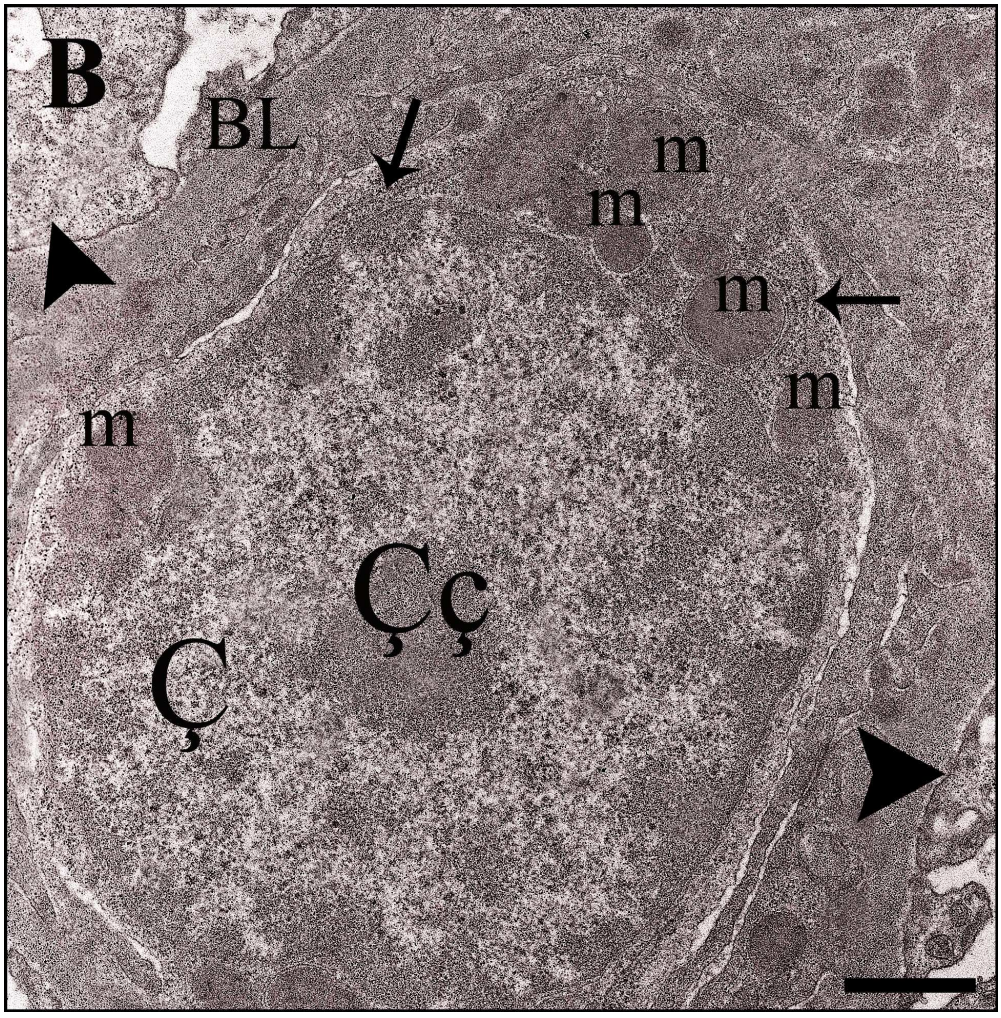
Deney grubuna ait ince kesitlerde glomerül kılcal damar ağı içerisine yerleşmiş olarak çok sayıda mezangiyum hücrelerine rastlandı. Mezangiyum matriksi içerisine gömülü bu hücrelerin farklı şekillerde gözlenen çekirdekleri vardı. Kromatin yoğunluğu çekirdeğin koyu görünmesinine neden olmuştu. Mezangiyum hücreleri glomerül kılcal damar yumağı içerisinde bulunan podosit ve endotel hücreleri

arasında, sahip oldukları heterokromatin yapıda gözlenen çekirdekleri ile kolayca ayırt ediliyordu. Bazı kesitlerde çekirdeğin orta bölgesine yerleşmiş küçük boyutlu çekirdekcikler görüldü. Sitoplazma organel çeşitliliği açısından dikkati çekecek şekilde zengindi. Farklı boyutlarda ve sayıda mitokondriyonlar bulunduran mezangiyum hücreleri saptandı. Mitokondriyon kristalarının boyları ve matriks yoğunlukları farklı mezangiyum hücrelerinin mitokondriyonlarında değişiklik gösteriyordu. Mitokondiyonlara komşu yerleşen granüllü endoplazma retikulumu sarnıçları kontrol grubuna benzer şekilde ayırt ediliyordu. Mikrofilamanlar sitoplazma içerisinde hücre zarına yakın bölgelerde bol miktarda görülüyordu.

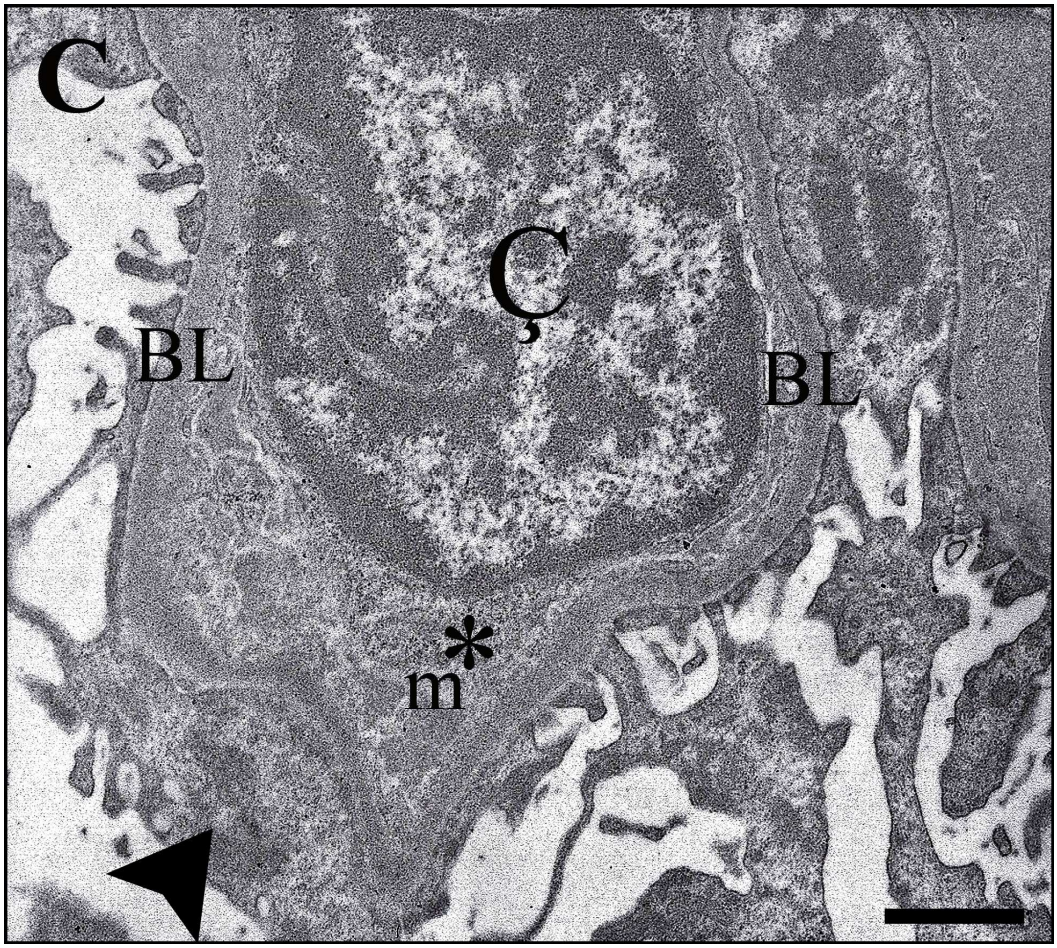
Mezangiyum hücrelerinin çevresinde mezangiyum matriksi elektron yoğun görünümlüydü. Bu yoğun görünüm içerisinde mezangiyum hücrelerinin sitoplazmik uzantıları, komşu bazal laminaya doğru yönelerek bazal laminanın derinliklerine gömülmüş olarak izlendi. Mezangiyum hücresinin sitoplazma zarı, bazı bölgelerde hücre içine doğru kese yapıp vezikülleri oluşturuyordu (Şekil 4.7.5 A- E).



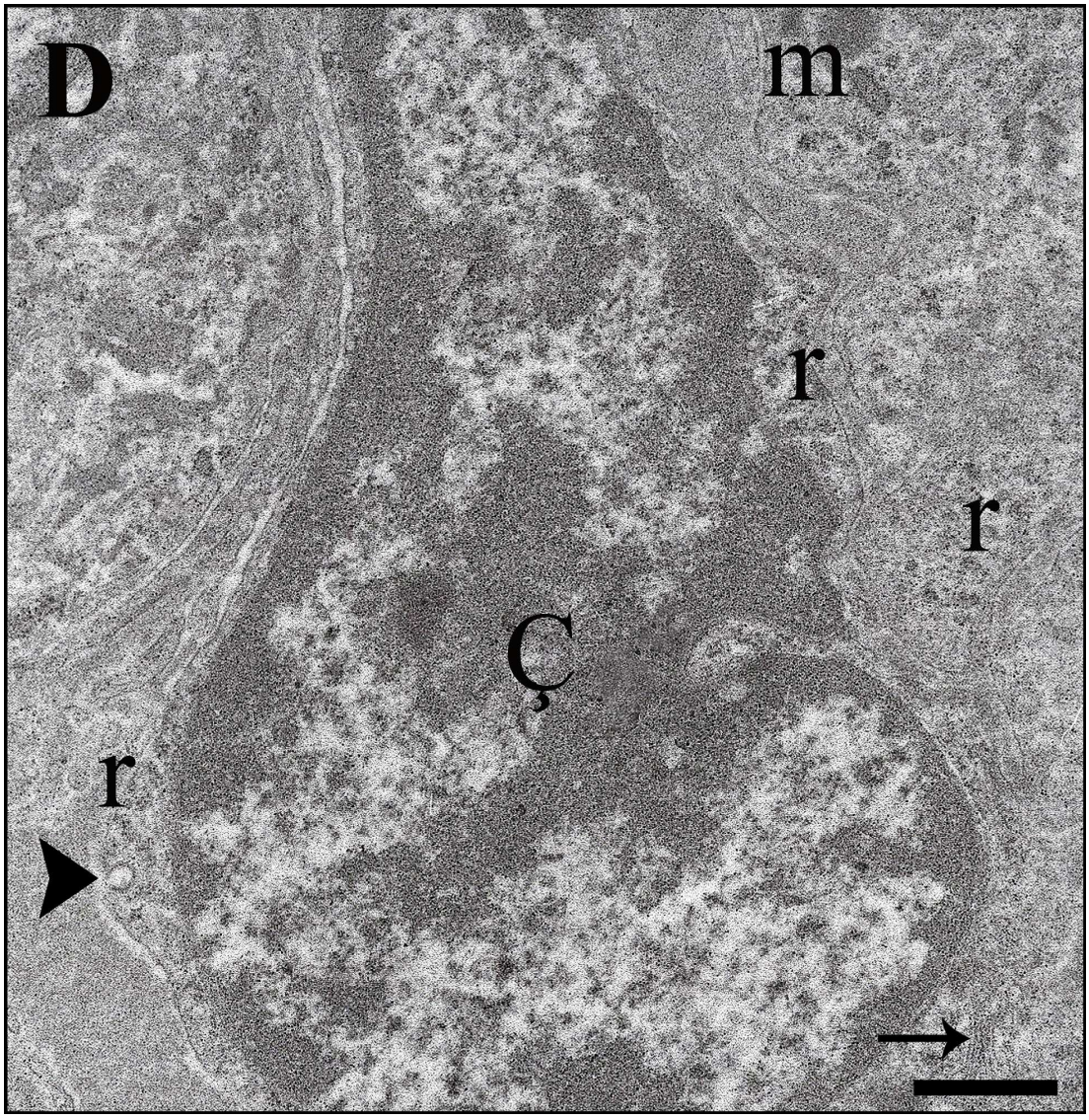
Şekil 4.7.5A Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi çekirdeği (Ç), mitokondriyon (m), mikrofilaman içeren sitoplazma (asteriks), granüllü endoplazma retikulumu (ince ok), bazal lamina (BL), podosit ayakçıklarında birleşme (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 1,21 µm



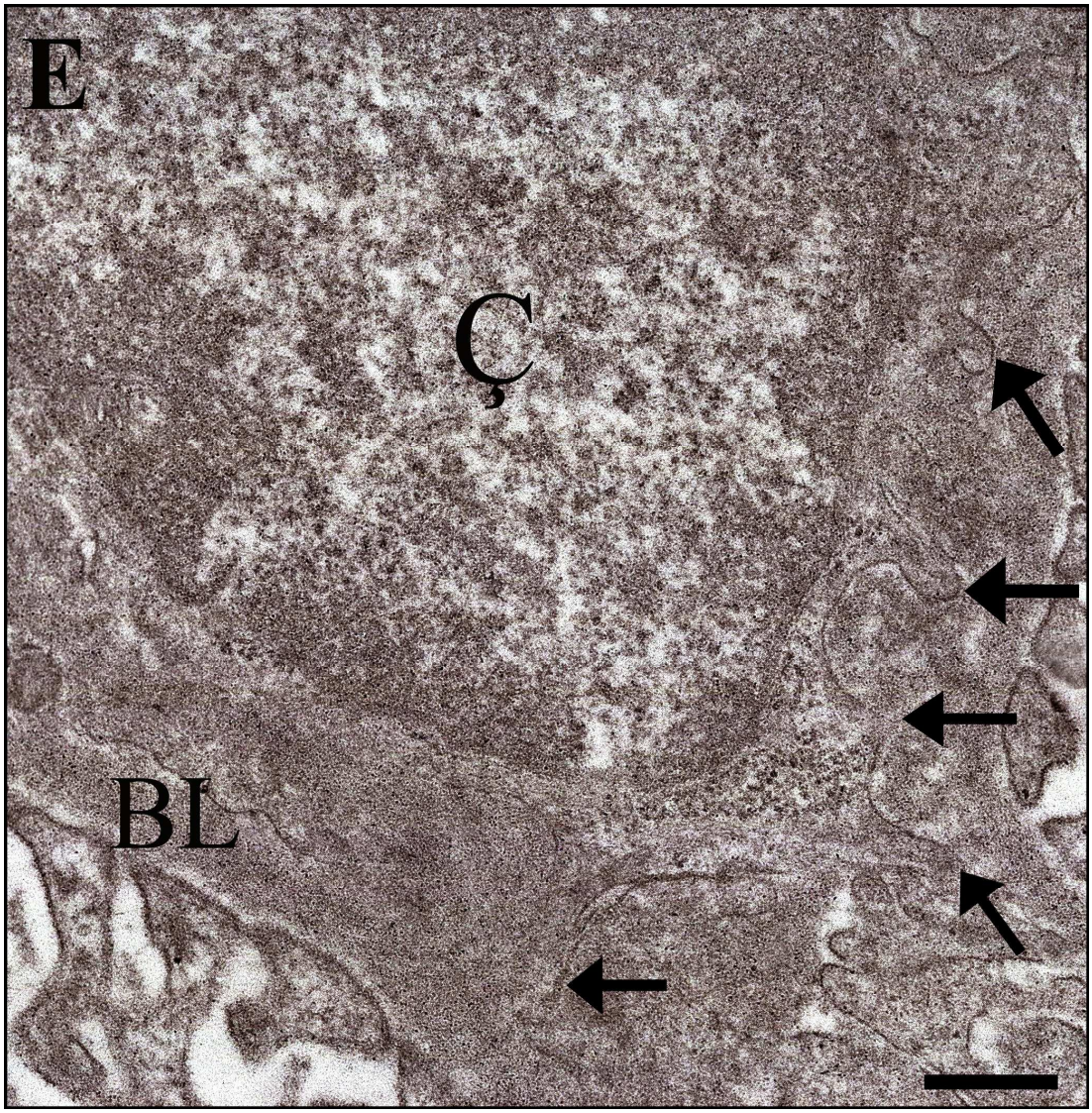
Şekil 4.7.5B Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi çekirdeği (Ç), mezangiyum hücresi çekirdekciği (Çç), mitokondriyon (m), granüllü endoplazma retikulumu (ince ok), bazal lamina (BL), podosit ayakçıklarında birleşme (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 1,21 µm



Şekil 4.7.5C Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi çekirdeği (Ç), mitokondriyon (m), mikrofilaman içeren sitoplazma (asteriks), bazal lamina (BL), podosit ayakçıklarında birleşme (ok başı). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 1,21 µm



Şekil 4.7.5D Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi çekirdeği (Ç), komşu mezangiyum hücre sitoplazmasında mitokondriyon (m), granüllü endoplazma retikulumu (ince ok), kaplı vezikül (ok başı), rozet yapmış ribozomlar (r). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 0,72 µm



Şekil 4.7.5E Deney grubu böbrek dokusu ince kesiti. Mezangiyum hücresi çekirdeği (Ç), bazal lamina (BL), mezangiyum hücresinin bazal lamina içerisine yapmış olduğu uzantılar (ok). Uranil asetat-kurşun sitrat, Bar: 0,56 µm

5. TARTIŞMA

Böbrek mezangiyum hücrelerinin yapı ve işlevlerini değiştirerek çeşitli uyarılara ya da zararlı ajanlara cevap verme yetenekleri olduğu bilinmektedir. Mezangiyum hücrelerinin plastisitesi patolojik bulgulardaki morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerle bağlantılıdır. Birçok glomerül hastalığı hasarın başlangıç alanı olan mezangiyumu hedef alır. Glomerülleri ilgilendiren problemlerde mekanizmalar oldukça komplekstir ve açıklığa kavuşturulacak onlarca soru bulunmaktadır. Hasar yapıcı ajanların sorumlu olduğu; mezangiyum hücrelerinin fenotipik değişimlerine neden olan spesifik mekanizmaların belirlenmesi oldukça önemlidir. Mezangiyum hücrelerinde ekstrasellüler matriks üretiminden ve yıkımından sorumlu sinyal yolaklarıyla ilgili çalışmalar sürdürülmektedir (15).

Mezangiyum hücreleri birçok glomerülleri tutan böbrek hastalığında anahtar rol oynamaktadır. DM; mezangiyum hücrelerinde ve glomerüllerde skleroz oluşturarak hasar yaratan nefropatilerden biridir. DM' un böbrek dokusu üzerinde yaptığı değişiklikler streptozotosin ve alloksan gibi çeşitli diyabet yapıcı ajanlar kullanılarak deney hayvanlarında gösterilmiştir (55, 57, 59, 60). STZ' nin, reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna neden olarak pankreasta β hücre hasarına yol açtığı bilinmektedir (55). Çalışmamızda diyabet oluşturmak amacıyla tek doz 50 mg/kg i.p. STZ verilen sıçanların böbrekleri 5 hafta sonunda çıkarılarak uygun tespit ve takip işlemlerinin ardından ışık, konfokal ve elektron mikroskobunda değerlendirildi.

Deney modeli olarak diyabet oluşturulan sıçanların kullanıldığı başka çalışmalarda 4-8 haftalık deney sonunda diyabetik sıçanların vücut ağırlıklarında azalma olduğu bildirilmiştir (55, 61, 62). Bizim çalışmamızda da diyabet grubuna aldığımız sıçanların kan şekerlerinde % 417'lik artış olduğunu, ağırlıklarında ise % 17,42'lik bir azalma oluştuğunu tespit ettik.

Makino ve ark. diyabetik nefropatiyi fenotipik olarak matrikste protein birikimi olarak tanımlamış, artan matriks proteinlerinin mezangiyum hücrelerinde morfolojik değişikliklere neden olduklarından bahsetmiştir. Diyabette ekspresyonu artmış tip 3,

4, 6 kollajenin ve kaldezmonun glomerülosklerozun önceden tahmininde faydalı olabileceğini dile getirmişlerdir (63).

Bu çalışma için deney modeli olarak diyabet oluşturulmuş sıçanların böbreklerinde özellikle böbrek cisimciklerinin mezangiyum bölgesini incelemeyi amaçladık. Işık ve konfokal mikroskobunda yapılan değerlendirmelerde böbrek cisimcikleri, tüpler, interstisiyel alan ve damarlardaki değişimleri göz önüne aldık. Elektron mikroskobunda ise özellikle böbrek cisimciklerinde yer alan; mezangiyum hücreleri, podositler, Bowman yaprağına ait pariyetal epitel hücreleri ve endotel hücrelerini gösterdikleri ince yapı değişiklikleriyle değerlendirdik.

Diyabetin kronik komplikasyonlarının patogenezinde artmış oksidatif stresin ve ileri glikozilasyon son ürünlerinin önemli olduğu bilinmektedir (64-66). Oksidatif stres; serbest radikallerin oluşumuna ve antioksidan sistemin koruyucu aktivitesinin azalmasına neden olur. Tip 1 ve 2 diyabette serbest radikallerin artışı bir risk faktörü olarak değerlendirilebilir (66). İleri glikozilasyon son ürünleri plazmada ve diyabetik hastaların doku proteinlerinde birikir, diyabetik komplikasyonların şiddeti ile korelasyon gösterir hale gelir (67, 68). Diyabetes mellitusun insan ve hayvan modellerinde neden olduğu kronik böbrek hasarında; oksidatif stres ve ileri glikozilasyon son ürünleri ile ekpresyonu artan TGF-β ve hepatosit growth factor (HGF) gibi yüksek molekül ağırlıklı büyüme faktörlerinin etkisinden bahsedilmektedir (67, 69). TGF-β' nın güçlü fibrozis oluşturucu etkisi, hem matriks sentezini arttırmasından hem de anormal miktardaki matriksin uzaklaştırılmasındaki defektten kaynaklanmaktadır (69, 70).

Glikozilasyon hipotezini ilk ortaya atan; 1912 yılında yiyeceklerde bulunan şekerler üzerinde yaptığı çalışmalarla Maillard olmuştur. İlerleyen yıllarda ilk olarak hemoglobin molekülünün glikozilasyon işlemlerinden sonra Hb A1C'yi oluşturması ve Hb A1C' nin diyabetik hastaların son üç aylık hiperglisemi kontrollerinde kullanılması hasta takibinde bir devrim yaratmıştır (71).

Alejandro, ileri glikozilasyon son ürünlerine ait reseptörlerin mezangiyum hücre yüzeyinde bulunabileceğine, reseptörlerin uyarılmasıyla PDGF sekresyonunun gerçekleşebileceğine dikkat çekmiştir. PDGF sentezi gerçekleştiğinde tip 4 kollajen, laminin, heparan sülfat proteoglikanların yapımının uyarıldığını ve mezangiyum ekspansiyonu sonrasında da glomerülosklerozisin meydana geldiğini belirtmiştir (71).

İleri glikozilasyon son ürünlerinin oluşumu çeşitli mekanizmalarla doku hasarına neden olmaktadır. İleri glikozilasyon son ürünleri glomerül bazal membranında birikerek albuminüriye ve kronik böbrek yetmezliğine yol açmaktadır (72). İleri glikozilasyon son ürünleri biyokimyasal ve immunokimyasal yöntemlerle ölçülebilmektedir (73). Mezangiyum hücre yüzeyindeki ileri glikozilasyon son ürünlerine ait reseptörlerin inhibisyonu veya proteaz inhibitörleri TIMP-3 ve PAI-1'in nötralizasyonu ile, diyabetik nefropatide önemli bir tedavi yaklaşımı oluşturabileceği bildirilmiştir (74).

Diyabetes Mellitusta; böbrek tübülüslerinde görülen en belirgin lezyon proksimal tübülüslerin düz parçasında ve henle kulpunun çıkan kısmı olan distal tübülüs epitel hücrelerinde (75) ve jukstaglomerüler kompleksin bir parçası olan makula densada (76) glikojen birikimidir. Yapılan araştırmalarda böbrek tübülüs hücrelerinin; düşük hiperglisemi kontrolüne sekonder olarak glikozu aşırı miktarda reabsorbe ettikleri ve hücre içerisinde glikojen biriktiği gösterilmiştir (77).

IGF-1 diyabetik nefropati sırasında tübülüslerin etkilenmesinde önemli bir mediyatördür. Tübülüslerde karbonhidrat metabolizması; proksimal tübülüslerde glikoneogenez, distal segmentlerde glikolitik enzimler ve renal papilla düzeyinde yüksek aldoz redüktaz aktivitesine bağlıdır. Diyabetes mellitusda glikoneogenez asit-baz dengesindeki değişiklikler ile uyarılmaktadır. Yağ asitleri ve keton cisimlerinin oksidasyonu yoluyla piruvat dehidrogenaz aktivitesinin inhibisyonu mitokondriyonlarda glikoz oksidasyonunu azaltmaktadır (78).

J. Kang ve ark. yaptıkları çalışmada; sıçanlarda tek doz alloksan kullanarak deneyden 1, 3 ve 6 ay sonra böbrek dokusu tübülüslerinde glikojen birikimini değerlendirdiklerinde, distal tübülüs ve ince parça epitel hücrelerinde glikojen birikimini alloksan verilmesinden 1 ay sonra, proksimal tübülüslerde ise ancak 6 ay sonra izlemişlerdir (79).

Bizim çalışmamıza ait ışık mikroskobi düzeyindeki gözlemlerimizde; bazı proksimal ve distal tübülüs epitel hücrelerinde H-E, alsiyan mavisi-PAS, PAS, gümüşleme, Masson'un trikrom boyamalarıyla saydam görünüm izledik. Epitel hücrelerindeki bu saydam görüntüyü özel bir tüp bölgesine ait olarak gözlemlemedik. Tüm kesitler değerlendirildiğinde özellikle PAS boyamalarında glikojen birikimini düşündürten proksimal kıvrıntılı tübülüslerde izlenen dejenerasyonu distal tübülüsün makula densa bölgesinde de gözledik. Oysa kontrol grubuna ait böbrek kesitleri tübülüs epitel hücrelerinde; ne saydam görüntü ne de glikojen birikimine bağlı dejenerasyon bulgularını saptadık.

DM sıklıkla anormal lipid metabolizması ile birlikte olabilir. DM'un insülinden bağımsız tipinde serum glukoz ve serbest yağ asitlerinin seviyesinin yükselmesi trigliserid ve VLDL'nin karaciğer sentezini uyarır, böylece serum LDL düzeyi ve LDL' nin glikozilasyonunu arttırır. İnsülin bağımlı DM'da ise insülin bağımlı lipoprotein lipaz aktivitesi azalır, VLDL'nin katabolizması gecikir (80).

Birçok araştırmacı diyabetik insanların ve hayvanların böbreklerinde lipid birikebildiğini göstermişlerdir, bu nedenle diyabetik böbrek hastalıklarının patogenezinde lipidlerin önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Diyabet oluşturulmuş sıçanlarda diyabetik nefropati patogenezinde çeşitli hormonların ve metabolik faktörlerin görev aldığından bahsedilmiştir; bunlar, anjiotensin II, TGF-β, VEGF, oksidatif stres, ileri glikozilasyon son ürünleri, nitrik oksit ve böbreklerde lipid birikimidir (81, 82, 83).

Kültür edilmiş mezangiyum ve tübülüs epitel hücrelerinin bulunduğu ortama LDL ve VLDL eklenmesi birtakım büyüme faktörlerinin; TGF-β, PAI-1,

ekstrasellüler matriks üretimini indüklediğini gösterdiğinden bu durum lipidlerin glomerülosklerozu başlatan medyatörleri direkt olarak etkilediğini düşündürtmektedir (84, 85, 86).

Böbrek tübülüslerine ait dejenerasyonun yağ depolanmasına ait olup olmadığını belirlemek için hücre içindeki nötral yağları kırmızı, yuvarlak birikim olarak gösteren Oil red O boyasını kullandık. Bu boyamanın sonuçları hayli ilginçti, kontrol grubuna ait böbrek kesitlerinde herhangi bir boyanma gözlenmezken, diyabet grubuna ait frozen kesitlerinde sadece proksimal tübülüs epitel hücrelerinin bazal yüzüne yakın belirgin yağ depolanması izledik. Yağ birikimlerinin bazal yüze komşu olması; bize bu bölgede bol miktarda olduğunu bildiğimiz aktif taşıma işlevi için ATP sentezinin yapıldığı mitokondriyonlardaki membran dejenerasyonlarına bağlı olabileceğini düşündürdü. Özellikle bu yağ birikimlerinin reabsorbsiyon işlevinin büyük bölümünün yapıldığı proksimal tübülüslerde olması bizim düşüncemizi doğrular biçimdeydi.

Zhuowei ve ark. fareler üzerinde yaptıkları çalışmada böbrekte lipid metabolizması ve lipid birikimini araştırmışlar, bu çalışmada üretilen transgenik farelerde glomerüllerde ve tübüllerde Oil red O boyamasıyla nötral yağ birikimini göstermişlerdir (81). Ancak bizim çalışmamızda bundan farklı olarak ne glomerüllerde ne de distal tübülüslerde yağ birikimi söz konusuydu. Sadece proksimal tübülüslerin bazal yüzüne yakın bölgede Oil red O boyası ile yağ birikimi olduğunu tespit ettik.

Miyofibroblastlar özel hücre topluluğudur hem fibroblast hem de düz kas benzeri özelliklere sahiptir; fibrozisli dokuda izlenirler ve ASMA'nında bulunduğu düz kas bağımlı proteinlerin de novo sentezini tipik olarak gösterirler. ASMA fizyolojik olarak damar düz kas hücreleri tarafından sentezlenir ve miyozin ile birlikte damar tonusunun düzenlenmesini sağlar, ayrıca bazı organ patolojilerinde inflamatuvar sitokinlerin ve matriksin kaynağı olarak fonksiyon gösterirler (87).

Miyofibroblastlar için ASMA ekspresyonu iyi bilinen özelliktir, sıkça kullanılan bir işaretleyicidir. Aktin filamanlarına yerleşen ASMA mokekülleri kollajeni kontrakte eder ve hücrelerin hücreler arası maddeye yapışmasını arttırarak hücre motilitesini yavaşlatır. Bu kontraktil fonksiyon deride yara iyileşmesine veya bağ dokusunda kapanma kuvveti oluşturulmasına hizmet eder. Buna rağmen diğer visseral organlarda (akciğer, karaciğer ve böbrek) patolojik durumlardaki miyojenik özellikleri iyi anlaşılamamıştır (87).

ASMA bir aktin izoformudur, normalde düz kas hücreleri tarafından eksprese edilmektedir (88). Mezangiyum hücrelerinde ASMA sentezi glomerülleri ilgilendiren çeşitli patolojik durumlarda söz konusudur. Bu durum sıklıkla mezangiyum hücre ve mezangiyum matriks artışının olmasıyla bir arada görülmektedir. Bu fenotipik değişim hasar sonrası aktive olan, farklanan ancak ışık mikroskobisinde transforme olduğu gösterilemeyen mezangiyum hücreleri için indikatör olarak kullanılabilir (88, 89).

Chebotevera ve. ark. yaptıkları bir çalışmada ASMA ile birlikte CD 34 ekspresyonunun; glomerülonefritli hastalarda hastalığın aktivasyonunun ve prognozunun değerlendirilmesinde kullanılabileceğini söylemişlerdir (90). Bizim çalışmamızda sıçan böbrek dokularını paraformaldehit ile fikse ettikten sonra frozen kesitleri alıp ASMA ile boyadık. Kontrol grubunda; normalde olması gerektiği şekilde sadece böbreğe ait damarların düz kas tabakasında ASMA ekspresyonunu gözlemledik. Deney grubunda ise ASMA özellikle glomerüllerin mezangiyum bölgesinde daha çok granüler formuyla dikkatimizi çekti, böbreğe ait tübülüs ve interstisiyel alan gibi diğer bölgelerde varlığını izlemedik. Essawy ve ark. yaptıkları çalışmada bizim bulgularımızdan farklı olarak diyabetik nefropatili hastaların bazı glomerüllerinde ve tübülüslerinde ASMA immunreaktivitesinde seyrek pozitiflik saptamışlardır (91).

Böbrekleri etkileyen birçok patolojik olguda ve bu patolojilerden biri olan diyabetik nefropatide mezangiyum bölgesinde ve interstisiyel alanda ekstrasellüler matriks bileşenlerinin birikimi ile oluşan, glomerüllere ve tübülüslere ait bazal

membranların kalınlaşması birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (59, 92, 94, 95).

Bazal membranda ve mezangiyumda izlenen bu kalınlaşmaya tip 3, 4, 5 kollajen birikimi, artmış hidroksiprolin ve hidroksilizin aktivitesinin neden olduğu savunulmaktadır. Mezangiyumun çevre glomerül bazal membranına doğru genişlemesinin glomerül bazal membranındaki kalınlaşmanın bir sebebi olarak ortaya çıktığı bazı makalelere konu olmuştur (96, 97). Çalışmamıza ait deney grubunun kesitlerinde ışık mikroskobu düzeyinde glomerüllere ve tübülüslere ait bazal membranlarda kalınlaşma saptadık. Masson'un trikrom boyası, alsiyan mavisi-PAS, PAS ve gümüşleme boyalarıyla pariyetal epitel hücrelerinin, glomerül kılcal damarlarının, proksimal ve distal tübülüslerin bazal membranlarında bu kalınlaşma daha belirgin olarak tespit edildi. Diyabetik nefropatinin bir bulgusu olan diffüz ve nodüler glomerülosklerozu; ışık mikroskobunda değerlendirdiğimiz kesitlerimizde özellikle gümüşleme ve alsiyan mavisi-PAS boyamalarında belirgin olarak gözledik. Mezangiyum hücre sayısındaki ve matriksteki artışa bağlı olarak gelişen mezangiyumdaki genişlemeyi; tüm boyalarda izledik.

Kontrol grubuna ait kesitlerde bazal membran komponenti olan laminine yönelik immünofloresan boyamalarımızda hem glomerüllere hem de tübülüslere ait bazal membranlar pozitif boyanmıştı. STZ ile diyabet oluşturulmuş deney grubuna ait frozen böbrek kesitlerinde ise glomerül bazal membranlarında ve mezangiyumda belirgin şekilde sinyal artışı gözledik. Brees ve ark. da bizim çalışmamızla uyumlu olarak STZ verdikleri sıçanların glomerül bazal membranında laminin ve fibronektin artışı izlemişlerdir (98).

Glomerüllere ait ekstrasellüler matriks morfolojik, biyokimyasal ve antijenik olarak heterojen yapıya sahiptir. Morfolojik özelliğine bakıldığında GBM ve mezangiyum matriksi olarak iki yapıdan meydana gelmektedir. Glomerül bazal membranı; lamina rara interna, lamina rara eksterna ve lamina densadan oluşmaktadır. Yapılan analizler sonucunda bu yapıların kollajenöz ve kollajenöz olmayan; glikoproteinler, heparan sülfat, kondroitin sülfat, proteoglikanlar ve

hiyaluronik asit gibi birimlerden oluştuğu ortaya konmuştur. Dokulardaki glikoproteinlerin immünohistokimyasal yöntemlerle boyanması ile bunların fibronektin, laminin gibi moleküller olduğu saptanmıştır (99). Pierre ve ark. yaptıkları çalışmada sıçan böbreğine ait GBM'da lamininin; en bol lamina rara interna ve eksterna da bulunduğunu, ayrıca mezangiyum matriksininin bir komponenti olduğunu söylemişlerdir (95).

Mezangiyumda genişleme, glomerül bazal membranında kalınlaşma diyabetik nefropatide proteinlerin artan birikimlerine bağlı beklenilen bir durumdur (100). Biriken proteinler bu bölgelerde normal şartlarda da bulunabilir ya da patolojik duruma sekonder olarak sonradan da var olabilirler (101). Laminin normal mezangiyumun küçük bir komponentidir. Diyabet sonrasında gelişen nefropatide artmış olması konusunda araştırmacılar arasında fikir birliğine varılamamıştır (101, 102, 103). Bizim çalışmamızda diyabet oluşturulmuş gruba ait böbrek kesitlerinde kontrol grubuna göre mezangiyumda artmış laminin sinyali söz konusuydu. Araştırmacılar diyabetik nefropatide GBM daki laminin miktarının; diyabetin erken safhasında artmış olabileceğini ama genelde ilerleyen safhalarda azalma eğiliminde olduğunu belirtmektedirler (101, 104-107). Deney grubuna ait böbrek dokusunun frozen kesitlerinin laminine yönelik immünofloresan boyamalarının konfokal mikroskobu ile değerlendirilmesinde; GBM'larının ve özellikle mezangiyum matriksinin bulunduğu bölgelerin kontol grubuna göre daha kuvvetli pozitif boyandığını gördük. Daha önce yapılmış çalışmalarla bulgularımızı karşılaştırdığımızda; bizim çalışmamızda yer alan STZ ile 5 hafta sonrasında diyabet oluşturulan sıçanların böbrek kesitlerinin, erken dönem diyabetik nefropati bulgularına sahip olduğunu düşündük.

Diyabetes mellitusda böbreklerin interstisiyumunda; süperimpoze olmuş bir enfeksiyona veya kronik böbrek yetmezliğine bağlı olarak inflamasyon gözlenebilir. İnflamasyonun şiddeti glomerüloskleroz ve interstisiyel fibrozisin miktarı ile orantılıdır (51). Bizim çalışmamızda da tübülointerstisiyel alanda damar duvarından interstisiyuma ekstravaze olmuş inflamatuvar hücreler olduğunu ve belirgin ödem sıvısının biriktiğini gözledik.

Diyabetik nefropati için özellikle afferent ve efferent arteriyollerin intimasında hiyalin materyalinin birikimine bağlı olarak gelişen arteriyolosklerozis patognomonik bir bulgudur (51). Bizim çalışmamızda özellikle Masson'un trikrom boyası ve PAS boyasıyla afferent ve efferent arteriyollerde ve interstisiyumdaki damar duvarlarında kas tabakası bulunması gereken bölgede, fonksiyonu bozuk kollajenin birikimiyle oluşan hiyalin materyalin varlığını saptadık.

Diyabetik nefropatide patognomonik bir bulgu olarak sayılan kapsüler drop; Bowman membranının iç yüzünde plazma proteinlerinin birikimine bağlı olarak eozinofilik, homojen hiyalin görünümde lezyonlar olarak izlenir (51). Bizim bulgularımızda da Bowman membranını oluşturan pariyetal epitel hücrelerinin hipertrofik olduklarını ve kabalaşarak Bowman aralığını doldurduklarını gözledik.

Diyabetik nefropatide elektron mikroskobunda ortaya çıkan ilk bulgu glomerül bazal membranlarının kalınlaşmasıdır. Bunun ardından mezangiyumda genişleme, mezangiyum hücre sayısında artış, podosit sayısında azalma, podosit ayakçıklarında birleşme, elektron dens hiyalinozis ve sklerozis alanları ve sklerotik nodülün içerisine yerleşmiş mezangiyum fibrilleri izlenir (94). Çalışmamıza ait elektron mikroskobu ile yaptığımız incelemeler ışık mikroskobunda gözlenen bulguları destekler nitelikteydi. Elektron mikroskobunda tüm alanlarda gözlenen böbrek cisimciklerinde özellikle glomerül bazal membranlarında kalınlaşma görüldü. Bazı kesitlerde mezangiyum hücrelerine komşu glomerül bazal membranında ondülalı görünümün eşlik ettiği kalınlaşma dikkat çekiciydi. Literatürde belirtilen podosit sayısında gözlenen azalma hem yarı ince kesitler hem de ince kesitler incelendiğinde bizim çalışmamızda tespit edilemedi. Birçok alanda podosit ayakçıkları birleşmişti ve bu birleşmenin sonucunda filtrasyon aralıkları izlenemiyordu. Glomerül kılcal damar endotel hücrelerine ait fenestralar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin olarak düzenliliğini yitirmişti. Mezangiyum hücrelerinin sayıları bazı glomerül kesitlerinde dikkati çekecek şekilde artmıştı. Mezangiyumun genişlemiş olduğu, sklerotik değişiklikler gösterdiği izlendi. Mezangiyum hücrelerinin çevresinde mezangiyum matriksi elektron yoğun görünümlüydü. Bu yoğun görünüm içerisinde

mezangiyum hücrelerinin sitoplazmik uzantıları, komşu bazal laminaya doğru yönelerek bazal laminanın derinliklerine gömülmüş olarak izlendi. Bu görünümleriyle membranda biriken materyalleri fagositoz özellikleri ile ortadan kaldırdıkları izlenimini verdi. Mezangiyum hücre sitoplazması; mitokondriyon, granüllü endoplazma retikulumu, ribozomlar ve filamanlardan zengindi. Ancak asıl fagositozla sorumlu olan lizozomların sitoplazmada görülmeyişini mezangiyum matriksinde materyal birikimine neden olan faktörlerden biri olarak değerlendirdik.

Mezangiyum glomerülün fonksiyonel ve yapısal çekirdeği olarak kabul edilir, bu özelliğinden dolayı glomerülleri tutan hastalıklarda hasarlanan önemli bir alan haline dönüşür. Mezangiyum hücresinin davranışı ve matriks biyolojisinin anlaşılması, böbrek hastalıklarının tedavisinde yeni terapotik yaklaşımların tasarlanmasını sağlayabilir. Çalışmamızda böbrek cisimciğinin anahtar bölgesi özelliği taşıyan mezangiyumun; özellikle farklı mikroskop teknikleri kullanarak ince yapısının değerlendirilmesiyle, bu bölgede hasar oluşturan faktörlerin hücre düzeyindeki etkilerinin anlaşılmasına ışık tutacağını ve ileride yapılacak olan klinik çalışmalar için kaynak oluşturacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- STZ ile diyabet oluşturulan grupta; böbrek tübülüs epitel hücrelerinde şeffaf görünüm izledik. Bu görünümün hiperglisemiye sekonder gerçekleşen aşırı glikoz reabsorbsiyonu nedeniyle hücre içinde glikojen birikimine bağlı olduğunu düşündük.

- Proksimal tübülüs epitel hücrelerinin bazal yüzüne komşu bölgede; Oil red O boyasıyla kırmızı boyanan yağ vakuollerini gözlemledik. Nötral yağ birikiminin hücrelerin bazal yüzüne yakın bölgede lokalize olan mitokondriyon membran dejenerasyonu nedeniyle olabileceği kararına vardık.

- Diyabetik nefropatinin patognomonik bulgularından olan; arteriyolar hiyalinozisi, afferent ve efferent glomerüler arteriyollerde ve tübülointerstisiyel damarlarda intima tabakasında dejenere kollajen birikimine bağlı olarak gözledik.

- Deney grubunda özellikle glomerüllerin mezangiyum bölgesinde ASMA'nın artmış olduğunu tespit ettik. Bu bulgu nedeniyle mezangiyum hücrelerinin miyofibroblast yönünde fenotipik değişim gösterdiğini düşündük.

- Diyabet oluşturulmuş grupta glomerüllere ve tübülüslere ait bazal membranlarda gözlenen belirgin kalınlaşmayı; burada yapımı artmış ya da yıkımı azalmış olan bazal membran proteinlerinin birikiminin varlığına bağladık.

- Diyabetik nefropati tanısında karakteristik olarak değerlendirilen; mezangiyumda genişleme, nodüler ve diffüz glomerüloskleroz, Bowman

membranında ve tübülüs bazal membranlarında kalınlaşma, interstisiyel alanda fibrozis ve ödem bizim çalışmamızda da deney grubunda saptadığımız bulgulardı.

- Laminine yönelik immünohistokimyasal boyamalarımızda deney grubu glomerül bazal membranlarında ve mezangiyumda artmış sinyal varlığı erken dönem diyabet bulgularıyla uyumlu olarak değerlendirdik.

- Elektron mikroskobu gözlemlerimizde özellikle böbrek cisimciği mezangiyum hücreleri ve matriksteki değişikliklere odaklandık. Glomerül çatısında dejeneratif değişiklikler eşliğinde glomerül bazal membranlarında kalınlaşma, podositlerin ayakçıklarında birleşme ve filtrasyon aralıklarında daralma, mezangiyumda sklerozis, hücre sayısında artış, hücre uzantılarında çevre bazal membranı derinliklerine doğru gömülme, mezangiyum hücre sitoplazmasında artmış organeller ve hücre iskeleti elemanı gözledik. Mezangiyum hücrelerinin bu görünümleriyle membranda biriken materyalleri fagosite ederek ortadan kaldırmaya çalıştıklarını düşündük. Tüm bu bulgularla mezangiyum hücrelerinin patolojik süreçlerde ince yapı düzeyinde değişikliklere uğradığı sonucuna vardık.

ÖZET

Böbrek Mezangiyum Hücrelerinin Normal ve Deney Koşulları Altında Yapı Özelliklerinin İncelenmesi

Mezangiyum bölgesi işlevsel ve yapısal olarak glomerülün merkezini oluşturduğundan, glomerülleri ilgilendiren birçok hastalığın başlangıç aşamasında ilk etkilenen hedef bölge olarak hasar görmektedir. Mezangiyum hücreleri hasara cevap olarak genellikle çok hızla prolifere olurlar ve fenotipik değişime uğrarlar. Mezangiyum mikro çevresinde meydana gelen değişiklikler sırasında homeostazı korumak için mezangiyum sitoplazmasında meydana gelen değişikliklerin anlaşılması çok sayıda glomerül hastalığının progresyonunun değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmada, deney modeli olarak tek doz 50mg/kg i.p. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların böbrek dokuları, ışık, konfokal ve elektronmikroskobunda incelenip değerlendirilmiştir. Glomerüllerde oluşan hasar sonucunda, mezangiyum hücrelerinin sergiledikleri yapısal değişikliklerin histolojik yöntemlerle gösterilmesi amaçlanmıştır.

Diyabet oluşturulan grupta; ışık mikroskobu düzeyinde mezangiyumda genişleme, nodüler sklerozis, retiküler liflerde artış, Bowman membranında kalınlaşma, pariyetal epitel hücrelerinde hipertrofi, arteriyollerin duvarında hiyalinozis, tübülüs bazal membranlarında kalınlaşma, proksimal tübülüs epitel hücrelerinde lipid birikimi, tübülüs epitel hücrelerinde glikojen birikimi, interstisiyumda ödem ve inflamatuvar hücre artışı, konfokal mikroskobunda mezangiyumda laminin ve ASMA sinyalinde artış saptandı. Elektron mikroskobunda ise GBM'nında kalınlaşma, mezangiyumda sklerozis, mezangiyum hücre sayısında artış, hücre uzantılarının çevre bazal membranına yönelmesi, sitoplazmada artmış organeller ve hücre iskeleti elemanı, podosit ayakçıklarında birleşme, podositlerin mitokondriyonlarında dejeneratif değişiklikler ve filtrasyon aralıklarında daralma izlendi.

Sonuç olarak bu bulgular ışığında diyabetin hasar oluşturucu etkisine bağlı olarak mezangiyum hücrelerinin ince yapı düzeyinde ve fenotiplerinde değişime uğradıkları tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: böbrek cisimciği, mezangiyum hücreleri, diyabet, ince yapı, geçirimli elektron mikroskobu

SUMMARY

The Assessment of Structural Features of Renal Mesangial Cells under Natural and Experimental Conditions

Mesangium serves as the core of the glomerulus from a functional and structural point of view; thus many of the glomerular disorders target the mesangium as the primary and/or initial site of injury. Mesangial cells generally proliferate with an increasing pace in response to injury and undergo phenotypic alterations. In evaluating the progression of many glomerulopathies, it is of great significance to understand the changes occuring in the cytoplasm of mesangial cells in order to maintain the homeostasis during the changes in the immediate site of mesangium.

In this study, the renal tissues of 50 mg / kg STZ induced diabetic rats were examined and evaluated under the light, confocal and electron microscope. It is aimed to reveal the morphological and functional changes exhibited by the mesangial cells after the damage in the glomeruli via histological methods.

In diabetes induced rats, under light microscope, mesangial expansion, nodular sclerosis, increase in reticular fibers, thickening in Bowman membranes, hypertrophy in the parietal epithelial cells, hyalinosis in arterioles, thickening in the tubules basement membranes, lipid accumulation in proximal tubules, glycogen accumulation in tubules, inflammation and oedema in interstitial tissue, and under confocal microscope, increase in laminin and ASMA signals were observed. Additionally, under the electron microscope, thickening in glomerular basement membrane, sclerosis in mesangium, increase in the number of mesangial cells, branching cytoplasmic processes into the adjacent basement membranes, increase in the number of organelles and cytoskeleton elements of cytoplasm, effacement in the foot processes of the podocytes, degenerative changes in the mitochondria of the podocytes, and narrowing in the filtration slits were observed.

As a result, in the light of these findings it is found out that mesangial cells exhibited ultra-structural and phenotypic alterations due to the damaging effect of diabetes.

Key Words: renal corpuscle, mesangial cells, diabetes, ultrastructure, transmission electron microscope

KAYNAKLAR

1. Moore KL, Persaud T.V.N. Development of urinary system. In: Moore KL, Persaud T.V.N, eds. *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*. 8th edition, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008: 243-260.

2. Carlson BM. Urogenital system. In: Carlson BM, ed. *Human Embryology and Developmental Biology*. 3rd edition, Philadelphia: Elsevier Mosby, 2004: 393-401.

3. Seçkin İ, Oğuz EG. Ürogenital Sistem. In: Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F, eds. *Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri Before We Are Born.* 7. baskı, Ankara: Güneş Tıp kitapevleri, 2009: 164-173

4. Sadler TW. Urogenital system. In: Sadler TW, ed. *Langman's Medical Embryology*. 10th edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 229-239.

5. Schoenwolf G, Bleyl S, Brauer P. Development of the urogenital system. In: Schoenwolf G, Bleyl S, Brauer P, eds. *Larsen's Human Embryology*. 4th edition, Churchill Livingstone, 2008: 479-499.

6. Kirsten M, Madsen T. Anatomy of the kidney. In: Brenner BM, eds. *Brenner & Rector's The Kidney*. Volume 1, 7th edition, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2004: 3-71.

7. Güven C. İdrar üretme ve boşaltma sistemi. In: Tekelioğlu M, editör. *Özel Histoloji: İnce Yapı ve Gelişme.* Ankara: ANTIP A.Ş, 2002: 191-213.

8. Agati V, Jennette C, Silva F. Non- neoplastic kidney diseases: Normal renal anatomy, histology, and development. In: King D, ed. *Atlas of Nontumor Pathology*. Washington: American Registry of Pathology, 2005: 1-17.

9. Manjeri A, Kriz V. Anatomy. In: Jennette C, Olson J, Schwartz M, Silva F, eds. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. 5th edition, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998: 3-66

10. Ross MH, Pawlina W. Urinary System. In: Ross MH, Pawlina W, eds. *Histology A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology.* 5th edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 647-669.

11. Stevens A, Lowe j. Urinary System. In: Stevens A, Lowe j, eds. *Histology*. Hong Kong: Mosby Year Book Europe Limited, 1993: 271-296.

12. Kierszenbaum AL. Urinary System. In: Kierszenbaum AL, ed. *Histology and Cell Biology.* Philadelphia: Mosby, 2002: 365-390.

13. Junqueira LC, Carneiro J. The Urinary Sysrem. In: Junqueira LC, Carneiro J, ed. *Basic Histology Text & Atlas.* 11th edition. USA: The McGraw-Hill Companies, 2005: 373-392.

14. Gartner LP, Hiatt JL. Urinary System. In: Gartner LP, Hiatt JL, eds. *Color Text Book of Histology*. 3rd edition. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007: 437-488.

15. Herrera GA. Plasticity of Mesangial Cells: A Basis for Understanding Pathological Alterations. *Ultrastructural Pathology*. 2006; 30: 471-479.

16. Sedor JR, Konieczkowski M, Huang S. Cytokines, mesangial cell activation and glomerular injury. *Kidney Int Suppl*. 1993; 39: 65–70.

17. Keeling J, Teng J, Herrera GA. AL-amyloidosis and light chain deposition disease light chains induce divergent phenotypic transformations of human mesangial cells. *Lab Invest*. 2004; 84: 1322–1338.

18. Truong LD, Majesky MW, Pindur J. Tenascin is synthesized and secreted by rat mesangial cells in culture and is present in extracellular matrix in human glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol.* 1994; 4: 1771–1777.

19. Sorokin L, Ekblom P. Development of tubular and glomerular cells of the kidney. *Kidney Int.* 1992; 41: 657–664.

20. Holthöfer H, Sainio K, Miettinen A. The glomerular mesangium: studies of its developmental origin and markers in vivo and in vitro. *APMIS*. 1995; 103: 354–366.

21. Farquhar MG, Palade GE. Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus: phagocytosis of filtration residues by a distinctive ‘‘third’’ cell. *J Cell Biol.* 1962; 13: 55–87.

22. Schreiner GF, Unanue ER. Origin of the rat mesangial phagocyte and its expression of the leukocyte common antigen. *Lab Invest.* 1984; 51: 515–523

23. Schreiner GF. The mesangial phagocyte and its regulation of contractile cell biology. *J Am Soc Nephrol*. 1992; 2: 74–82.

24. Keeling J, Teng J, Herrera GA. AL-amyloidosis and light chain deposition disease light chains induce divergent phenotypic transformations of human mesangial cells. *Lab Invest.* 2004; 84: 1322–1338.

25. Schlondorff D. The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J.* 1987; 1: 272–281.

26. Sedor JR. Cytokines and growth factors in renal injury. *Semin Nephrol.* 1992; 12: 428–440.

27. Ooi BS, Cohen DJ, Veis JH. Biology of the mesangial cell in glomerulonephritis: role of cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996; 213: 230–237.

28. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-b: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int.* 1992; 41: 557–559.

29. Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 55: 639–652.

30. Saito K, Shimizu F, Sato T, Oite T. Modulation of human mesangial cell behaviour by extracellular matrix components: the possible role of interstitial type III collagen. *Clin Exp Immmunol.* 1993; 91: 510–515.

31. Martin J, Eynstone L, Davies M, Steadman R. Induction of metalloproteinases by glomerular mesangial cells stimulated by proteins of the extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 88–96.

32. Cosio FG, Sedmak DD. Nahman NS Jr. Cellular receptors for matrix proteins in normal human kidney and human mesangial cells. *Kidney Int.* 1990; 38: 886–895.

33. Gomez-Guerrero C, Duque N, Egido J. Mesangial cells possess an asialoglycoprotein receptor with affinity for human immunoglobulin A. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9: 568–576.

34. Lopez-Armada MJ, Gomez-Guerrero C, Egido J. Receptors for immune complexes activate gene expression and synthesis of matrix proteins in cultured rat and human mesangial cells: role of TGF-beta. *J Immunol.* 1996; 157: 2136–2142.

35. Knauss TC, Me´ne P, Ricanati SA, et al. Immune complex activation of rat glomerular mesangial cells: dependence on the Fc region of antibody. *Am J Phys.* 1990; 257: 478–485.

36. Russell WJ, Cardelli J, Harris E, Baier RJ, Herrera GA. Monoclonal light chain: mesangial cell interactions: early signaling events and subsequent pathologic effects. *Lab Invest.* 2001; 81: 689–703.

37. Abboud HE. Platelet-derived growth factor and mesangial cells. *Kidney Int.* 1992; 41: 581–583.

38. Gesualdo L, Ranieri E, Pannarale G, Di Paolo S, Schena FP. Platelet-derived growth factor and proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1993; 39: 86–89

39. Laiho M, DeCaprio JA, Ludlow JW, Livingston DM, Massague J. Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell.* 1990; 62: 175–185.

40. Keeling J, Herrera GA. Matrix metalloproteinases and mesangial remodeling in light chain-related glomerular damage. *Kidney Int.* 2005; 58: 1590–1603.

41. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF-β1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int.* 1994; 45: 916–927.

42. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-b in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1–7.

43. El-Nahas AM. Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring. *Kidney Int*. 2003; 64: 1553–1563.

44. Teng J, Russell WJ, Gu X, Cardelli J, Jones ML, Herrera GA. Different types of glomerulopathic light chains interact with mesangial cells using a common receptor byt exhibit different intracellular trafficking patterns. *Lab Invest.* 2004; 84: 440–451.

45. Johnson RJ, Floege J, Yoshimura A, Iida H, Couser WG, Alpers CE. The activated mesangial cell: a glomerular ‘‘myofibroblast’’? *J Am Soc Nephrol.* 1992; 2: 190–197.

46. Patel K, Harding P, Haney LB, Glass WF II. Regulation of the mesangial cell myofibroblast phenotype by actin polymerization. *J Cell Physiol.* 2003; 195: 435–445.

47. Imai K, Kusakabe M, Sakakura T, Nakanishi I, Okada Y. Susceptibility of tenascin to degradation by matrix metalloproteinases and serine proteinases. *FEBS Lett.* 1994; 352: 216–218

48. Turbat-Herrera EA, Isaac J, Sanders PW, Truong LD, Herrera GA. Integrated expression of glomerular extracellular matrix proteins and beta 1 integrins in monoclonal light chain-related renal diseases. *Mod Pathol.* 1997; 10: 485–495

49. Agati V, Jennette C, Silva F. Non- neoplastic kidney diseases: Diabetic Nephropathy In: King D, ed. *Atlas of Nontumor Pathology*. Washington: American Registry of Pathology, 2005: 457-479.

50. Parving HH, Mauer M, Ritz E. Diabetic Nephropathy In: Brenner BM, ed. *Brenner & Rector’s The Kidney*. Volume 2, 7th edition, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2004: 1178-1818.

51. Kern W, Laszik ZG, Nadasdy T, Silva FG, Bane BL, Pitha JV. The Kidney in Metabolic Disorders: Diabetes Mellitus, Hyperuricemia, Oxalosis,

Nephrocalcinosis, and Nephrolithiasis. In: Kern W, ed. *Atlas of Renal Pathology*. Philadelphia: Saunders Company, 1999: 97-108

52. Olson JL. Diabetes Mellitus In: Jennette C, Olson J, Schwartz M, Silva F, eds. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. 5th edition, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998: 1247-1286.

53. Vestra MD, Fioretto P. Diabetic nephropathy: renal structural studies in type 1 and type 2 diabetic patients. *International Congress Series*. 2003; 1253: 163-169.

54. Fioretto P, Bruseghin M, Barzon I, Arboit M, Vestra MD. Diabetic nephropathy: An update on renal structure. *International Congress Series*. 2007; 1303: 51-59.

55. Vardı N, Iraz M, Öztürk F, Uçar M, Gül M, Eşrefoğlu M, Otlu A. Deneysel diyabetin sıçan böbreklerinde meydana getirdiği değişiklikler üzerine melotoninin iyileştici etkileri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005; 12: 145-152.

56. Tesch GH, Allen TJ. Rodents models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology*. 2007; 12: 261-266.

57. Öztürk Y, Aydın S. Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin on calcium responsiveness of the rat vas deferens. *Life Sciences*. 2006; 78: 1084-1090.

58. Yaras N, Bilginoglu A, Vassort G, Turan B. Restoration of diabetes-induced abnormal local calcium release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292: 912-920.

59. Yakan B, Eşrefoğlu M. Deneysel diabetes mellitusda böbreklerin ince yapısı ve selenyumun düzeltici etkileri. *T Klin Tıp Bilimleri*. 1995; 15: 255-259.

60. Öztürk F, Iraz M, Eşrefoğlu M, Kuruş M, Gül M, Otlu A. Deneysel diyabetin sıçan böbreklerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2005; 12: 1-4.

61. Cam M, Yavuz O, Güven A. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pineal Res.* 2003; 35: 212-220.

62. Aksoy N, Vural H, Sabuncu T. Effects of melatonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochemistry and Function.* 2003; 21: 121-125.

63. Makino H, Kashihara N, Sugiyama H, Kanao K, Sekikawa T, Shikata K, Nagai R, Ota Z. Phenotypic changes of the mesangium in diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications.* 1995; 9: 282-284.

64. Doi T, Mima A, Matsubara T, Tominaga T, Arai H, Abe H. The current clinical problems for early phase of diabetic nephropathy and nephropathy and approach for pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2008; 8:21-24.

65. Vardı N, Iraz M, Gül M, Öztürk F, Uçar M, Otlu A. Diyabetin böbreklerde neden olduğu histolojik değişiklikler üzerine aminoguanidinin iyileştirici etkileri. *J. Med. Sci.* 2006; 26: 599-606.

66. Liptakova A, Carsky J, Ulicna O, Vancova O, Bozek P, Durackova Z. Influence of β-resorcylidine aminoguanidine on selected metabolic parameteres and antioxidant status of rats with diabetes mellitus. *Physiol Res.* 2002; 51: 277-284.

67. Suziki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, Uchida K, Izuhara Y, Yagame M, Sakai H, Kurokawa K. Immunohistochemical evidence for an

increased oxidative stres and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10: 822-832.

68. Friedman EA. Advanced glycation end-products in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14: 1-9.

69. Reeves WB, Andreoli TE. Transforming growth factor β contributes to progressive diabetic nephropathy. *PNAS.* 2000; 97: 7667-7669.

70. Flyvjerg A. Putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease. *Diabetologia.* 2000; 43: 1205-1223.

71. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *JAOA.* 2000; 100: 621-634.

72. Kurowski R, Manitius J. Advanced glycation end products (AGEs) and renal failure. *Przegl Lek.* 2006; 63: 203-208.

73. Noordzij MJ, Lefrandt JD, Smit AJ. Advanced glycation end products in renal failure: an overview. *Journal of Renal Care.* 2008; 34: 207-212.

74. Berrou J, Tostvint I, Verrecchia F, Berthier C, Boulanger E, Mauviel A, Marti HP, Wautier MP, Wautier JL, Rondeau E, Hertig A. Advanced glycation end products regulate extracellular matrix protein and protease expression by human glomerular mesangial cells. *Int J Mol Med.* 2009; 23: 513-520.

75. Tsuchitani M, Kuroda J, Nagatani M, Miura K, Katoh T, Saegusa T, Narama I, Itakura C. Glycogen accumulation in the renal tubular cells of spontaneously occurring diabetic WBN/Kob rats. *J Comp Pathol.* 1990; 102: 179-190.

76. Mauer SM, Steffes MW, Michael AF, Brown DM. Studies of diabetic nephropathy in animal and man. *Diabetes.* 1976; 25: 850-857.

77. McCane KL, Huether S. Pathophysiology the biologic basis for disease in adults and children. In: McCane KL. *Altered cellular and tissue biology.* Mossby, 1994: 73-78.

78. Guder WG, Schmolke M, Wirthensohn G. Carbonhydrate and lipid metabolism of the renal tubule in diabetes mellitus. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1992; 30: 669-674.

79. Kang J, Dai XS, Yu TB, Wen B, Yang Z. Glycogen accumulation in renal tubules, a key morphological change in the diabetic rat kidney. *Acta Diabetol.* 2005; 42: 110-116.

80. Saito T. Abnormal lipid metabolism and renal disorders. *Tohoku J. Exp. Med.* 1997; 181: 321-337.

81. Wang Z, Jiang T, Li J, Proctor G, McManaman JL, Lucia S, Chua S, Levi M. Regulation of renal lipid metabolism, lipid accumulation, and glomerulosclerosis in FVB mice with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005; 54: 2328-2335.

82. Guijarro C, Kasiske BL, Kim Y, Donnell MP, Lee HS, Keane WF. Early glomerular changes in rats with dietary-induced hypercholesterolemia. *Am J Kidney Dis.* 1995; 26: 152-161.

83. Lee HS, Lee JS, Koh HI, Ko KW. Intraglomerular lipid deposition in routine biopsies. *Clin Nephrol.* 1991; 36: 67-75.

84. Okada M, Takemura T, Yanagida H, Yoshioko K. Response of mesangial cells to low-density lipoprotein and angiotensin II in diabetic rats. *Kidney Int.* 2002; 42: 1717-1726.

85. Song CY, Kim BC, Hong HK, Kim BK, Kim YS, Lee HS. Biphasic regulation of plasminogen activator/inhibitor by LDL in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 283: 423-430.

86. Lee HS. Oxidized LDL, glomerular mesangial cells and collagen. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999; 45: 117-122.

87. Takeji M, Moriyama T, Oseto S, Kawada N, Hori M, Imai E, Miwa T. Smooth muscle α-actin deficiency in myofibroblasts leads to enhanced renal tissue fibrosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 40193-40200.

88. MacPherson BR, Leslie KO, Lizaso KV, Schwarz JE. Contractile cells of the kidney in primary glomerular disorders: an immunohistochemical study using an anti-alpha-smooth muscle actin monoclonal antibody. *Hum Pathol.* 1993; 24: 710-716.

89. Naruse K, Fujieda M, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Kuroda N, Hiroi M, Kurashige T, Enzan H. Mesangial myofibroblastic transformation in steroid-dependent minimal change nephrotic syndrome. *Med Electron Microsc.* 2000; 33: 102-107.

90. Chebotareva NV, Proppe D, Rudolf P, Kozlovskaia LV. Clinical significance of expression of the smooth muscle actin-alpha and CD34 antigen in mesangial cells in glomerulonephritis. *Ter Arkh.* 2002; 74: 27-31.

91. Essawy M, Soylemezoglu O, Muchaneta C, Shortland J, Brown B, Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12: 43-50.

92. Lehman R, Schleicher ED. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clinica Chimica Acta.* 2000; 297: 135-144.

93. Reeves BR, Andreoli TE. Transforming growth factor β contributes to progressive diabetic nephropathy. *PNAS.* 2000; 97: 7667-7669.

94. Alsaad KO, Herzenberg AM. Distinguishing diabetic nephropathy from other causes of glomerulosclerosis: an update. *J Clin Pathol.* 2007; 60:18-26.

95. Courtoy PJ, Tımpl R, Farquhar MG. Comparative distribution of laminin, type 4 collagen and fibronectin in the rat glomerulus. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 1982; 30: 874-886.

96. Makino H, Yamashi Y, Hironaka K, Ota Z. Glomerular extracellular matrices in rat diabetic glomerulopathy by scanning electron microscopy. *Wirchows Arch B Cell Pathol.* 1992; 62: 19-24.

97. Osterby R, Bangstad HJ, Nyberg G, Rudberg S. On glomerular structural alterations in type-1 diabetes: companions of early diabetic glomerulopathy. *Virchows Arch.* 2001; 438: 129-135.

98. Brees DK, Hutchison FN, Cole GJ, Williams JC. Differantial effects of diabetes and glomerulonephritis on glomerular basal membrane. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996; 212: 69-77.

99. Thomas GJ, Shewring L, McCarthy KJ, Couchman JR, Mason RM, Davies M. Rat mesangial cells in vitro synthesize a spectrum of proteoglycan species including those of the basement membrane and interstitium. *Kidney International.* 1995; 48: 1278-1289.

100. White KE, Bilous RW. Type 2 diabetic patients with nephropathy show structural-functional relationships that are similar to type 1 disease. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 1667-1673.

101. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matriks metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 1358-1373.

102. Makino H, Shikata K, Wieslander J, Wada J, Kashihara N, Yoshioka K, Ota Z. Localization of fibril/microfibril and basement membrane collagenes in diabetic glomerulosclerosis in type 2 diabetes. *Diabet Med.* 1994; 11: 304-311

103. Nerlich A, Schleicher E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *Am J Pathol.* 1991; 139: 889-899.

104. Suzuki D. Measurement of the extrasellular matrix in glomeruli from patients with diabetic nephropathy using an automatic image analyser. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 1994; 36: 1209-1215.

105. Falk RJ, Scheinmann JI, Mauer SM, Michael AF. Polyantigenic expansion of basement membrane constituents in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 1983; 32: 34-39.

106. Ikeda S, Makino H, Haramoto T, Shikata K, Kumagai I, Ota Z. Changes in glomerular extracellular matrices components in diabetic nephropathy. *J Diabet Complications.* 1991; 5: 186-188.

107. Shimomura H, Spiro RG. Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes. Decreased levels of heparan sulfate proteoglycans and laminin. *Diabetes.* 1997; 36: 374-381.

EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ	:13/02/2008
TOPLANTI NO	:2008-19
DOSYA NO	:2008-17
KARAR NO	:2008-19-76

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Belgin Can'ın araştırma yürütücüsü olduğu, Dr.Ayşe Köse Sargın'ın "Böbrek Mezangiyum Hücrelerinin Normal ve Deney Koşulları Altında Yapı Özelliklerinin İncelenmesi"başlıklı çalışmaları, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, çalışma daha önce alınmış 14/11/2007 tarihli 2007-11-39 nolu karar da dikkate alınarak, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunmuş ve onaylanmasına, katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

T.C.

ASLININ AYNIDIR
13/02/2008

Prof.Dr.Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurulu Başkanı