



**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**NEFROTİK SENDROMLU ÇOCUKLARIN BÖBREK BİYOPSİ  
ÖRNEKLERİNDE SPHINGOMYELIN PHOSPHODIESTERASE  
ACID-LIKE 3B (SMPDL-3B) EKSPRESYONU İMMUNSUPRESİF  
İLAÇ CEVABINDA YOL GÖSTERİCİ OLABİLİR Mİ?**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Arş. Gör. Dr Muhammet KAYA**

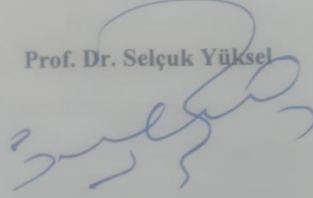
**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. İlknur GİRİŞGEN**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 16/01/2020 tarih ve 1 nolu kararı ile desteklenmiştir

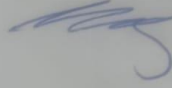
**ŞUBAT 2022**  
**DENİZLİ**

Doç. Dr. İlknur Girişen danışmanlığında Dr. Muhammet Kaya tarafından yapılan " Nefrotik sendromlu çocukların böbrek biyopsi örneklerinde Sphingomiyelin phosphodiesterase acid-like 3b (SMPDL-3b) ekspresyonu immünsüpresif ilaç cevabında yol gösterici olabilir mi ? " başlıklı tez çalışması gün 16/02/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

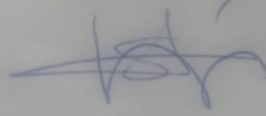
BAŞKAN Prof. Dr. Selçuk Yüksel



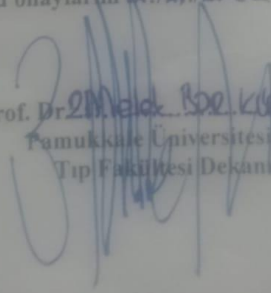
ÜYE Doç. Dr. İlknur Girişen



ÜYE Prof Dr. Ferah Sönmez



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım 10.02.2022

Prof. Dr.  Ferah Sönmez  
Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi süresince hoşgörü, emek ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tezimin tüm aşamalarında bana büyük katkıda bulunan, bu süreçte yönlendirmeleriyle akademik çalışma konusunda düşüncelerimi şekillendiren kıymetli hocam Doç.Dr. İlknur GİRİŞGEN'e

Tez çalışmamda bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Selçuk Yüksel'e

Başta Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı başkanı değerli hocam Prof. Dr. Dolunay GÜRSES olmak üzere uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, üzerimde emeği olan tüm hocalarıma ve uzmanlarıma

Tezimin hazırlanmasında emek harcayan ve patoloji örneklerinin değerlendirilmesi aşamasında bilgileri ve tecrübeleri ile bana destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Nagihan YALÇIN ve Dr. Öğr. Üyesi Gülsün GÜLTEN'e, patoloji laboratuvarından Birsen Türegün , Yağmur Özyılmaz ve Öznur Kösem olmak üzere tezimin hazırlanma aşamasında yardımcı olan Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve çalışanlarına

Yoğun mesai saatlerimiz ve nöbetlerde birlikte çalışmaktan keyif aldığım beraber güzel anılar biriktirdiğim asistan arkadaşlarım, hemşire ve personel arkadaşlarıma

Her zaman yanımda olan annem Mürvet KAYA, babam Cesim KAYA ve kardeşlerime

Çalışma hayatım boyunca üzerinde emeği olan herkese gönülden teşekkürlerimi borç bilirim

Dr.Muhammet KAYA

Denizli, 2022

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
TABLolar DİZİNİ .....	vii
ÖZET .....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Glomerüler mikrosirkülasyon yapısı ve fonksiyonu .....	3
2.2. Nefrotik sendrom .....	5
2.2.1. Tanım - Epidemiyoloji.....	5
2.2.2. Sınıflandırma ve etyoloji.....	5
2.2.3. Patogenez.....	7
2.2.4. Klinik belirtiler, bulgular ve laboratuvar incelemeleri .....	9
2.2.5. Böbrek biyopsi endikasyonları .....	10
2.3. Nefrotik sendromda tedavi.....	11
2.3.1. İmmünsüpresif tedavilerin etki mekanizmaları .....	12
2.3.2. Nefrotik sendromda ilk atak tedavisi .....	15
2.3.3. Steroide duyarlı nefrotik sendromda relaps tedavisi .....	16
2.3.4. Sık relaps ve steroide bağımlı NS tedavisinde steroidden koruyucu ajanlar .....	17
2.3.5. Steroide dirençli nefrotik sendrom tedavisi.....	19
2.3.6. Kalsinörin ve steroide dirençli nefrotik sendromda tedavi seçenekleri .....	21
2.3.7. SRNS'li hastalarda kullanılan ek tedaviler ( Renin angiotensin-aldosteron sistem (RAS) inhibisyonu) .....	21
2.4. Prognoz.....	21
2.5. Podosit iskelet yapısı ve tedavi hedeflerindeki yeri.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	28
4. BULGULAR .....	33
4.1. Dokuların SMPDL-3b ekspresyonunun Real time PCR ile değerlendirilmesi .....	35
4.2. Dokuların SMPDL-3b boyanmalarının immunohistokimyasal karşılaştırılması.....	41
5. TARTIŞMA .....	43
6. SONUÇ .....	49
7. KAYNAKLAR.....	51

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	:	Anabilim Dalı
BD	:	Bilim Dalı
İNS	:	İdiopatik Nefrotik Sendrom
MDH	:	Minimal Değişiklik Hastalığı
SSNS	:	Steroid Sensitif Nefrotik Sendrom
SBNS	:	Steroid Bağımlı Nefrotik Sendrom
SRNS	:	Steroid Rezistans Nefrotik Sendrom
MN	:	Membranöz Nefropati
SMPDL-3b	:	Sphingomiyelin Phosphodiesterase Acid-like 3b
MPGN	:	Membranoproliferatif Glomerülonefrit
KDİGO	:	Kidney Disease Improving Global Outcomes
GBM	:	Glomerüler bazal membran
ABD	:	Anabilim Dalı
BD	:	Bilim Dalı
İNS	:	İdiopatik Nefrotik Sendrom
SD	:	Slit diafram
GFB	:	Glomeruler filtrasyon bariyeri
FSGS	:	Fokal Segmental Glomeruloskleroz
KNS	:	Konjenital Nefrotik Sendrom
RAAS	:	Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi
ZO-1	:	Zonula okcludens-1
mRNA	:	Messenger ribonükleik asit
KNİ	:	Kalsinörin inhibitörleri
MMF	:	Mikofenolat mofetil
SPSS	:	Statistical Package for Social Sciences
mg :	:	Miligram
CLC-1	:	Cardiotrophin-like cytokine1
suPAR	:	Urokinase-type plasminogen activator receptor
GFR	:	Glomerüler filtrasyon hızı
CD2AP	:	CD2-ilişkili protein
TRPC6	:	Geçici reseptör potansiyel katyon kanal tip 6
FA	:	Fokal adezyon
Anj II	:	Anjiyotensin II
ASMase	:	Asit sfingomiyelinaz enzimi
PLA2R	:	Fosfolipaz A2 reseptör
KBH	:	Kronik böbrek hastalığı
PMP	:	Pulse metilprednizolon
CT	:	Cycle threshold
FC	:	Fold change
dk	:	Dakika
sa	:	Saat
m <sup>2</sup>	:	Metrekare
°C	:	Santigrad derece

# ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Glomerül yapısı .....	3
Şekil 2: Glomerüler filtrasyon bariyeri .....	4
Şekil 3: Podosit sitoskeletonu .....	5
Şekil 4: Nefrotik sendrom tedavisinde kullanılan İmmünesupresif ilaçların etki mekanizmaları.	12
Şekil 5: İdiyopatik nefrotik sendrom ilk atak tedavi algoritması .....	16
Şekil 6: İdiyopatik nefrotik sendromda relaps tedavisi .....	17
Şekil 7: Sık relaps veya steroide bağımlı nefrotik sendromda tedavi algoritması .....	18
Şekil 8: Podosit yapısı.....	22
Şekil 9: Glomerüler filtrasyon bileşenleri ve podosit hasarlanması.....	23
Şekil 10: Podosit ayak çıkıntıları içindeki makromoleküler kısımlar .....	23
Şekil 11: Seramidin farklı yollarla sentezi ve ASMase aktivitesi .....	25
Şekil 12: Sfingomiyelin seramid dönüşümü .....	26
Şekil 13: Rituksimab SMPDL-3b ilişkisi: .....	26
Şekil 14: Anti-SMPDL3B Pozitif glomerul (İHK ;400X) .....	31
Şekil 15: Anti-SMPDL3B negatif glomerul (İHK ;400X).....	31
Şekil 16: Anti-SMPDL3B Pozitif ince bağırsak dokusu (İHK ;100X).....	31
Şekil 17: İmmünesüresif yanıtlarına göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	36
Şekil 18: Steroid yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	36
Şekil 19: Relaps durumuna göre SMPDL-3b ekspresyonu.....	37
Şekil 20: Rituksimab yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	37
Şekil 21: KNI yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu.....	38
Şekil 22: MMF yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	38
Şekil 23: Biyopsi sonucuna göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	39
Şekil 24: Tüm hastalarda remisyon durumuna göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	40
Şekil 25: FSGS'li hastalarda progresyon durumuna göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	40

## TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Çocuklarda nefrotik sendrom etyolojisi ve sınıflandırılması.....	6
Tablo 2: Nefrotik sendromlu çocukların araştırılması .....	9
Tablo 3: Başlangıçta böbrek biyopsisi yapma endikasyonları .....	11
Tablo 4: Nefrotik sendromda tanımlar .....	12
Tablo 5: Verilerin nicelleştirilmesi için görsel derecelendirme sistemi.....	30
Tablo 6: Demografik bulgular .....	33
Tablo 7: Laboratuvar bulgular .....	33
Tablo 8: Hastaların Biyopsi Özellikleri .....	33
Tablo 9: Hastaların steroid yanıtına göre gruplandırılması.....	34
Tablo 10: Hastaların KNİ yanıtına göre gruplandırılması .....	34
Tablo 11: Hastaların MMF yanıtına göre gruplandırılması .....	34
Tablo 12: Hastaların siklofosamid yanıtına göre gruplandırılması.....	34
Tablo 13: Hastaların rituksimab yanıtına göre gruplandırılması .....	35
Tablo 14: Hastaların progresyon durumları .....	35
Tablo 15: Steroid yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	36
Tablo 16: Relaps durumuna göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	37
Tablo 17: Rituksimab yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	37
Tablo 18: KNİ yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu.....	38
Tablo 19: MMF yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	38
Tablo 20: Biyopsi sonucuna göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	39
Tablo 21: SMPDL-3b ekspresyonunun mutasyon varlığına göre karşılaştırılması .....	39
Tablo 22: Tüm hastalarda remisyon durumuna göre SMPDL-3b ekspresyonu.....	40
Tablo 23: FSGS'li hastalarda progresyon durumuna göre SMPDL-3b ekspresyonu .....	40
Tablo 24: İmmünsüresif yanıtına göre SMPDL-3b boyanması .....	41
Tablo 25: Biyopsi sonucuna göre SMPDL-3b boyanması.....	42
Tablo 26: Remisyon durumuna göre SMPDL-3b boyanması.....	42

## ÖZET

### **Nefrotik sendromlu çocukların böbrek biyopsi örneklerinde Sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3b (SMPDL-3b) ekspresyonu immünsüpresif ilaç cevabında yol gösterici olabilir mi?**

Dr.Muhammet Kaya

**Amaç:** İdiopatik nefrotik sendrom (İNS) çocuklarda sık görülen bir glomerüler hastalıktır. İNS'li hastaların çoğunluğu steroidde yanıt verse de sık relaps ve steroidde bağımlı hastalar steroid uzun süreli kullanımına bağlı yan etkilere maruz kalırken, steroid rezistans nefrotik sendromlu (SRNS) hastaların bir kısmı diğer immünsüpresiflere de dirençli olup kronik böbrek hastalığına (KBH) ilerleyebilmektedir. Günümüzde özellikle SRNS tedavisi hala çocuk nefrologları için sorun oluşturmaya devam etmektedir.

CD20 monoklonal antikör olan rituksimabın sık relaps ve steroid bağımlı NS tedavisinde başarısı kanıtlanmış olup SRNS ya da FSGS'li hastalarda tedavi etkinliği çalışmalarda değişkendir. SMPDL-3b podositlerin hücre zarında seramid sentezini sağlayarak podosit hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol alır. Son yıllarda yapılan çalışmalar rituksimabın B hücre depleksiyonundan bağımsız, SMPDL-3b ekspresyonunda down regülasyonu engelleyerek ya da SMPDL-3b'ye bağlanarak, proteinüriyi engellediğini ileri sürmektedir. Hatta tedaviye dirençli ileri derece podosit hasarının olduğu NS'li hastalarda rituksimabın bağlandığı SMPDL-3b miktarının düşük olması tedaviye dirençte bir neden olabilir mi sorusu literatürde henüz cevap bulamamıştır. Rituksimab ve SMPDL-3b ile ilişkili kısıtlı sayıdaki çalışmalardan yola çıkarak; tedavisi hala sorun olan özellikle SRNS ve FSGS'li hastalarda tedavi öncesi böbrek biyopsi preparatlarındaki SMPDL-3b düzeyi, başta rituksimab olmak üzere immünsüpresif ilaçların klinik etkinliğinde yol gösterici olabilir mi? sorusu ile çalışmamızı planladık.

**Yöntem:** Kliniğimizde İNS tanısı alıp böbrek biyopsisi yapılmış 48 hastanın biyopsi materyallerinde immunhistokimyasal anti-SMPDL3B boyanması ve moleküler tanı yöntemi Real time PCR ile SMPDL-3b m-RNA ekspresyonları değerlendirilip karşılaştırıldı. Real time PCR değerlendirme  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi ile yapıldı.  $FC>1,5$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



**Bulgular:** Real time PCR yöntemi ile SMPDL-3b ekspresyonu rituksimab ve steroid olmak üzere tüm immünsüpresif tedavilere yanıtı hastalarda artmış ekspresyonda saptansa da fold change (FC)<1,5 olduğu için anlamlı kabul edilmedi. Tedavi ile remisyona giren hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu KBH'li hastalara göre 1,788 kat fazlaydı ve anlamlıydı (FC>1,5) ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p:0,846). SRNS' li hastalarda remisyona giren hastalar ile KBH gelişen hastaların SMPDL-3b ekspresyonları karşılaştırıldığında; remisyondaki hastalarda ekspresyon 2,18 kat fazla ve anlamlıydı (FC>1,5). Anti-SMPDL3B boyanması steroid, rituksimab ve diğer immünsüpresiflere yanıt, genetik mutasyon varlığı ve progresyon durumlarına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

**Sonuç-Tartışma:** Çalışmamızda insan böbrek biyopsilerinde SMPDL-3b düzeyi düşük olan hastalar başta rituksimab olmak üzere immünsüpresif tedavilere daha mı dirençlidir sorusuna yanıt aradık. İmmünsüpresif tedavilerin yanıtlarında SMPDL-3b ekspresyonunun ve anti-SMPDL3B boyanmasının gruplar arasında anlamlı fark oluşturmadığını gösterdik. SMPDL-3b ekspresyonunun tüm hastalar arasında ve ek olarak SRNS'li grupta; tam remiyona giren hastalarda KBH'lilere göre daha fazla eksprese edildiğini gösterdik. Bu sonuçlar bize SMPDL-3b'nin aslında belli bir immünsüpresif ajana verilen yanıtın belirteci olmaktan çok hastalığın progresyonu konusunda işaretler veren bir belirteç olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamız insan böbrek biyopsi preparatlarında hem immunhistokimyasal hem de moleküler PCR ile SMPDL-3b mRNA ekspresyonuna bakılan literatürdeki ilk çalışmadır.

**Anahtar Kelimeler;** Nefrotik sendrom, SMPDL-3b, rituksimab, Real time PCR

## ABSTRACT

Do sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3b (SMPDL-3b) levels in kidney biopsy specimens predict response to immunosuppressive therapy in children with nephrotic syndrome?

**Objective:** Idiopathic nephrotic syndrome (INS) is a common glomerular disease in children. Although INS usually responds to steroids, patients with frequently relapse or steroid dependence face adverse effects associated with long-term steroid use. Some patients who develop steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) are also resistant to other immunosuppressants and can progress to chronic kidney disease (CKD). The treatment of SRNS remains a challenge for pediatric nephrologists.

Rituximab is a CD20 monoclonal antibody shown to be successful in the treatment of frequently relapsing and steroid-dependent NS, but its effectiveness in patients with SRNS or focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) has varied between studies. Sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3b (SMPDL-3b) contributes to the regulation of the podocyte cytoskeleton by enabling ceramide synthesis in the cell membrane. Recent studies suggest that rituximab prevents proteinuria independent of B-cell depletion by inhibiting the downregulation of SMPDL-3b expression or binding to SMPDL-3b. However, the question remains whether the low amount of SMPDL-3b for rituximab to bind in treatment-resistant NS patients with advanced podocyte injury could be the cause of treatment resistance. Based on the limited number of studies related to rituximab and SMPDL-3b, the present study was conducted to evaluate whether SMPDL-3b level in pre-treatment kidney biopsy is predictive of the clinical effectiveness of immunosuppressive drugs, especially rituximab, in patients with SRNS and FSGS.

**Methods:** Kidney biopsy specimens from 48 patients diagnosed with INS in our clinic were analyzed by immunohistochemical staining with anti-SMPDL3B and real-time polymerase chain reaction (PCR) for *SMPDL-3b* mRNA expression. The results were compared according to treatment response. Real time PCR evaluation was done with 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method. Fold change (FC)>1.5 was considered stastically significant.

**Results:** Real-time PCR results showed that *SMPDL-3b* expression levels were higher in patients responding to all immunosuppressive treatments, including rituximab and steroids, but it was not considered significant because the fold change (FC) was less than 1.5. *SMPDL3B* expression was 1.788 times greater in patients who achieved remission with treatment compared to patients with CKD. Although this was significant (FC>1.5), there was no statistically significant difference between the groups (p=0.846). When *SMPDL3B* expression was compared between patients with SRNS who achieved remission and those who developed CKD, expression was 2.18 times higher and significant in remitted patients (FC>1.5). No statistically significant differences were found in comparisons of anti-SMPDL3B staining based on response to steroids, rituximab, and other immunosuppressives, the presence of genetic mutations, and progression status.

**Conclusion:** In our study, we sought to determine whether low SMPDL-3b levels in pre-treatment kidney biopsies were associated with resistance to immunosuppressive therapies, especially rituximab. We showed that *SMPDL3B* mRNA expression and anti-SMPDL-3b staining did not differ significantly between patient groups with different responses to immunosuppressive therapies. Our results indicate that *SMPDL3B* expression is higher in patients with complete remission, both among all patients and within the SRNS subgroup, when compared with patients who progressed to CKD. These results suggest that SMPDL-3b may actually be an indicator of disease progression rather than a marker predicting response to a particular immunosuppressive agent. Our study is the first in the literature to examine SMPDL-3b levels in human kidney biopsy specimens using both immunohistochemical and molecular PCR methods.

**Keywords:** Nephrotic syndrome, SMPDL-3b, rituximab, real-time PCR

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nefrotik sendrom (NS) çocuklarda sık görülen glomerüler bir hastalıktır. İdiyopatik nefrotik sendrom (İNS), masif proteinüri, hipoalbüminemi, ödem ve hiperlipidemi ile karakterize klinik bir tablodur (1).

Etkilenen çocukların yaklaşık %80'ini minimal değişiklik hastalığı (MDH) oluşturur ve çoğu steroide duyarlı nefrotik sendrom (SSNS) olarak adlandırılır. Bu hastalar steroid tedavisine iyi yanıt verirler (2). SSNS'li çocukların yaklaşık %40'ında ise sık relapslar vardır veya steroid bağımlıdır (SBNS) (3).

Kortikosteroid tedavisi çocukluk çağı NS için birincil tedavi seçeneğidir. Bununla beraber, sık relaps veya steroid bağımlı NS hastaları, kortikosteroidlerin oluşturduğu yan etkiler açısından yüksek risk altındadır. Bu nedenle kortikosteroid tedavisine ek olarak alkilleyici ajanlar, kalsinörin inhibitörleri (KNİ'ler) ve mikofenolat mofetil (MMF) dahil olmak üzere diğer immünsüpresif ajanlar, bu tür çocuklarda remisyon sağlamak için kullanılır (4). İNS'li hastaların %10-20'si ise steroide yanıt vermez ve steroide dirençli nefrotik sendrom (SRNS) olarak adlandırılır. Bu hastalar, kronik böbrek hastalığına ilerlemelerinin yanı sıra birçok komplikasyonla karşı karşıyadırlar (5). KNİ, SRNS'yi tedavi etmede kullanılan ana immünsüpresif ajandır. KNİ'lere yanıt vermeyen çocuklara MMF gibi ek alternatif ajanlar sıklıkla kullanılmaktadır (5). Bununla birlikte, SRNS'nin yönetimi, pediatrik nefroloji hekimlerini zorlamaya devam etmektedir. SRNS tedavisi için optimal stratejinin olmaması araştırmacıları son on yılda yeni terapötik seçenekler aramaya yöneltmiştir (6).

Rituksimab, CD20 aracılı B hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını inhibe eden kimerik bir CD20 monoklonal antikordur. Nefrotik Sendrom, lupus nefriti ve vaskülit dahil olmak üzere böbrek bozukluklarının tedavisinde giderek daha fazla kullanılmaktadır (7). Yapılan çalışmalarla, SBNS ve SRNS'li çocuklarda rituksimaba oldukça değişken yanıt oranları saptanmıştır (7).

Son çalışmalarda, rituksimabın B hücre depleasyonu yanında sfingomyelin fosfodiesteraz asit like 3b'yi (SMPDL-3b) hedefleyerek podositler üzerinde doğrudan bir etkisi olduğu öne sürülmüştür (8). Bununla birlikte, pediatrik başlangıçlı İNS tedavisi için SMPDL-3b'nin etkileri belirsizliğini korumaktadır.

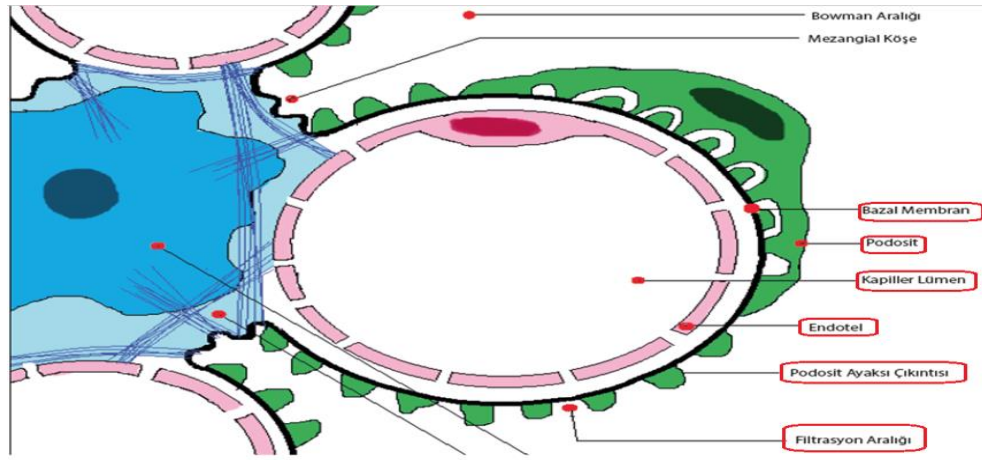
Bu alışmada NS alt tiplerinde, yine steroid ve diğer immunsüpresiflere yanıtına göre SMPDL-3b'nin podositlerdeki boyanmasının immunhistokimyasal olarak ve Real time PCR ile değerlendirmeyi amaçladık. Böylece SMPDL-3b boyanmasının rituksimab başta olmak üzere diğer immunsüpresif ilaçlara yanıtta yol gösterici olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Glomerüler mikrosirkülasyon yapısı ve fonksiyonu

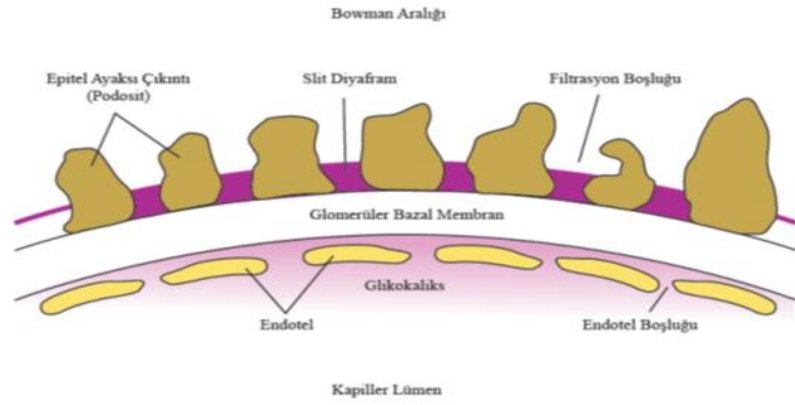
Böbrek yapısı makroskobik olarak böbreğin dış kısmı olan renal korteks ve iç kısmı olan medulla olmak üzere iki bölüme ayrılır (9). Mikroskobik olarak ise böbrek nefron adı verilen ve böbreğin fonksiyonel en küçük ünitesi olarak bilinen yapılardan oluşur (10). Nefronlar glomerül ve tübüler sistem olmak üzere iki kısımdan oluşur:

Glomerül; afferent arteriol ile efferent arteriol arasında bulunan özelleşmiş bir kapiller yumaktır ve tübüler sistemin başlangıcı olan bowman kapsülüne gömülü haldedir. Glomerüler kapillerler tek katlı ince endotel hücrelerinden oluşurlar ve bu endotel hücreleri glomerüler bazal membran (GBM) tarafından sarılmıştır. Bazal membranın dışında ise bowman kapsülünün visseral yaprağı olarak da adlandırılan podosit adlı epitel hücreleri yer alır. Podositler kapiller damarları dıştan sararken birbirlerine iç içe geçmiş parmaklara benzer şekilde organize olmuşlardır. Komşu podositler arasında oluşan aralığa filtrasyon aralığı adı verilir. Bu filtrasyon aralıkları slit diafram (SD) denilen proteinoz yapılarla örtülmüş durumdadır (10) (Şekil 1).



Şekil 1: Glomerül yapısı (10)

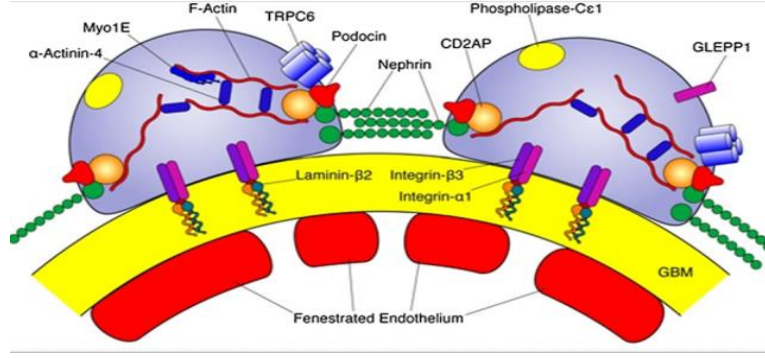
Sonuç olarak içten dışa doğru endotel hücresi, glomerüler bazal membran ve podosit katlarının biraraya gelerek oluşturduğu yapıya glomerüler filtrasyon bariyeri (GFB) adı verilir (Şekil 2). GBM'nin sentezi ve sürekliliği podositler ve endotelial hücreler tarafından sağlanır ve bu üç tabakanın herhangi birinde oluşan bir problem proteinüriye yol açar.



Şekil 2: Glomerüler filtrasyon bariyeri (10)

Glomerüler kapiller duvarın en iç kısmı, fenestra içeren endotel ile kaplanmıştır; tek bir pencere 50-100 nm boyutundadır ve birçok plazma proteininden 1 veya 2 kat daha büyüktür. GBM tip V kollajen, laminin, heparan sülfat, proteoglikanlar, entaktin ve diğer bileşenlerden oluşur. Endotel hücreleri GBM'ye bağlı olarak bulunur ve bu negatif yüklü bileşikler sayesinde albumin gibi anyonik makromoleküllerin filtrasyonu engellenir. Ancak bu durum ultrafiltrasyona karşı oluşturulan total rezistansın sadece %2'lik bir kısmına denk gelir. GBM ise negatif yüklü bileşikler sayesinde ultrafiltratın %50'lik bir kısmını engeller. Hidrolik rezistansın geri kalan kısmını ise podosit ayaksı çıkıntıları arasındaki yarıklar ve bunları döşeyen SD oluşturur. Filtrasyon aralıklarının etki alanı  $14 \text{ nm}^2$  ( $3,7 \times 3,7 \text{ nm}$ ) olup albumin  $3,6 \text{ nm}$ 'lik çapıyla bu aralıktan geçebilmektedir. Buna rağmen idrarda bulunan albumin miktarı çok azdır. Bunun nedeni de filtrasyon membranının her katmanının negatif yüklü olmasıdır. Podositler, hücre iskeleti dinamikleri ve yapısal plastisitesi sayesinde, glomerüler filtrasyon söz konusu olduğunda filtrasyon yarıkları içeren dinamik bir bariyer sağlayarak plazma proteinlerinin idrar ultrafiltratına girmesini önlemede aktif bir rol oynar (11).

Podositler integrinler ve distroglukanlar denilen iki ayrı protein sistemi ile bazal membrana bağlanırlar. Komşu ayaksı çıkıntılar birbirlerine SD denilen modifiye desmozomlar ile bağlıdır (12). Filtrasyon membranını örten SD'nin içerisinde nefrin, podosin, p kadherin, FAT, TRCP6, CD2AP ve NEPH gibi proteinler bulunur. Bu proteinler hücre membranını miyozin, aktin ve  $\alpha$ -aktinin içeren hücre iskeletine bağlarlar (13) (Şekil 3). SD yapısındaki bu proteinleri kodlayan genlerde mutasyon olduğunda podosit disfonksiyonu ve konjenital nefrotik sendrom ya da erken çocuklukluk SRNS, fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS) gibi hastalıklar ortaya çıkar (10, 13).



Şekil 3: Podosit sitoskeletonu (14)

## 2.2. Nefrotik sendrom

### 2.2.1. Tanım - Epidemiyoloji

NS, Glomerül filtrasyon bariyerinde geçirgenlik artışı sonucunda idrara çok miktarda protein içeriğinin kaçışına bağlı olarak ortaya çıkan tablodur. (15, 16)

Nefrotik sendrom bulguları (15, 17);

- Nefrotik düzeyde (masif) proteinüri ( $>40 \text{ mg/m}^2/\text{saat}$  ya da spot idrar örneğinde  $\text{protein/kreatinin} > 2 \text{ mg/mg}$ )
- Hipoalbuminemi ( $<3,0 \text{ g/dl}$  veya bazı kaynaklarda  $\leq 2,5 \text{ g/dL}$ )
- Ödem
- Hiperlipidemidir

Çocukluk çağında NS insidansı, coğrafik bölge ve etnik kökene göre değişmekle beraber 100.000 çocuk nüfusta 1.15 ile 16.9 arasında bildirilmiştir (15, 18-22). Çocukluk çağındaki NS'lerin büyük kısmını oluşturan SSNS en sık 1-4 yaş arasında görülür ve erkeklerde daha sıktır (erkek/kız oranı: 2/1) (15, 22, 23). Yaş büyüdükçe, SSNS insidansı düşerken SRNS ve sekonder NS'ler artar. Bir yaş altındaki süt çocuklarında NS insidansı düşüktür; ilk üç ay içinde ortaya çıkan NS'ler konjenital nefrotik sendrom (KNS) olarak tanımlanan özel bir grubu oluşturur. Üç ay ile bir yaş arasındaki NS ise infantil nefrotik sendrom olarak adlandırılır (15).

### 2.2.2. Sınıflandırma ve etyoloji

NS klinik tabloya, patogeneze, histopatolojik bulgulara, genetik inceleme sonuçlarına ve tedavi yanıtına göre sınıflandırılmaktadır (15). Genel klinik yaklaşımda öncelikle "primer" ve "sekonder" NS ayrımı yapılır (Tablo 1).



Tablo 1: Çocuklarda nefrotik sendrom etyolojisi ve sınıflandırılması (15-17)

<p><b>PRİMER NEFROTİK SENDROM</b></p>	<p><b>İdiyopatik nefrotik sendrom</b>          Histopatolojiye göre:  <input type="checkbox"/> Minimal değişiklik hastalığı  <input type="checkbox"/> Fokal segmental glomerüloskleroz          Steroid yanıtına göre:  <input type="checkbox"/> Steroide duyarlı nefrotik sendrom  <input type="checkbox"/> Steroide dirençli nefrotik sendrom  <b>Glomerülo nefritler</b>  <input type="checkbox"/> IgA nefropatisi  <input type="checkbox"/> Membranoproliferatif glomerülo nefrit  <input type="checkbox"/> C3 glomerülopatisi  <b>Genetik nefrotik sendrom</b>  <input type="checkbox"/> Nefrin  <input type="checkbox"/> Podosin  <input type="checkbox"/> Diğerleri</p>
<p><b>SEKONDER NEFROTİK SENDROM</b></p>	<p><b>Sistemik/otoimmün hastalıklar</b>  <input type="checkbox"/> Sistemik lupus eritematozus  <input type="checkbox"/> Henoch-Schönlein purpurası  <input type="checkbox"/> Mikroskopik polianjitis  <input type="checkbox"/> Hemolitik üremik sendrom  <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus  <input type="checkbox"/> Amiloidoz  <b>Enfeksiyonlar</b>  <input type="checkbox"/> B ve C hepatiti  <input type="checkbox"/> HIV  <input type="checkbox"/> Sıtma  <input type="checkbox"/> Şistozoma  <input type="checkbox"/> Doğumsal sifiliz  <b>Malign hastalıklar</b>  <input type="checkbox"/> Lenfomalar  <input type="checkbox"/> Lösemiler  <b>Allerjenler</b>  <input type="checkbox"/> Arı sokması  <input type="checkbox"/> Besin allerjisi  <b>İlaçlar/toksik maddeler</b>  <input type="checkbox"/> Non-steroidal antiinflamatuarlar  <input type="checkbox"/> D-penisilamin  <input type="checkbox"/> Altın tuzları  <input type="checkbox"/> Lityum  <input type="checkbox"/> Cıva  <input type="checkbox"/> Eroin  <b>Glomerüler hiperfiltrasyon</b>  <input type="checkbox"/> Morbid obezite  <input type="checkbox"/> Orak hücreli anemi  <b>Genetik hastalıklar</b>  <input type="checkbox"/> Alport  <input type="checkbox"/> Sendromik hastalıklar (Denys-Drash,Schimke, Pierson, Frasier, Galloway-Mowat...)</p>

Primer nefrotik sendrom, sistemik bir hastalık olmaksızın sadece böbrek tutulumunun olduğu hastalıkları tanımlar. Çocukluk çağında primer NS başlığı altındaki en büyük grubu İNS oluşturmasına karşın hastalık mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Böbrek biyopsi preparatları incelendiğinde spesifik immun birikim olmaksızın, elektron mikroskobu incelemesinde podositlerin ayaklı çıkıntılarının silinmiş olduğu minimal değişiklik hastalığı veya ışık mikroskopisinde FSGS görülür (15, 24).

Nefrotik sendromlu çocukların bir kısmında igA nefropatisi, membranoproliferatif glomerülo nefrit (MPGN) vs. hastalıklarında görüldüğü gibi primer bir glomerülo nefrit söz konusudur. Bu hastaların kliniğinde nefrotik sendrom

bulgularının yanı sıra nefritik sendrom bulguları, böbrek biyopsisinde ise immun birikimler ve glomerüler enflamasyon bulguları görülür.

Podositlerdeki çeşitli proteinleri kodlayan genetik mutasyonlar da, yaşamın ilk aylarından itibaren NS kliniğine yol açar (Genetik nefrotik sendrom) (15, 24).

İNS grubunda tanımlanan hastaların büyük kısmında, özellikle de MDH'de steroid tedavisi ile remisyon sağlanır. Steroide duyarlı hastaların önemli bir bölümünde ise hastalık relapslarla seyreder ve bu hasta grubunda bazen relapslar sık olabilir. Küçük bir grup hasta ise steroid tedavisinden fayda görmez veya başlangıçta tedaviye cevap gözlenmesine rağmen hastada daha sonra direnç gelişebilir (SRNS) (15, 25) .

Sekonder nefrotik sendrom, sistemik bir hastalığın komponenti olarak ortaya çıkan veya bilinen bir etkene bağlı glomerül hasarı sonucu oluşan hastalık tablolarını kapsar. Yetişkin hastalardan farklı olarak çocukluk çağında daha az görülür.

### **2.2.3. Patogenez**

Nefrotik sendromda esas fizyopatolojik mekanizma GFB'de meydana gelen protein geçirgenliğindeki artıştır. GFB; kapiller endoteli, bazal membran ve podositlerden oluşan yapıdır. GFB'nin yapısal bütünlüğünü bozan doğumsal veya edinsel pek çok etken proteinüriye yol açabilir (15).

Karaciğer aşırı protein kaybını lipoprotein sentezi ile telafi etmeye çalışan fizyolojiye sahiptir. NS, idrarla kaybedilen protein kaybı karaciğerdeki albümin sentez oranını aştığında ortaya çıkar, bu durum hipoalbüminemi ve ödem ile sonuçlanır (26).

Patogenez ile ilgili 3 farklı hipotez mevcuttur.

#### a) Podositler ve filtrasyon bariyeri

Podositler glomerüler filtrasyon bariyerinde çok önemli rol oynarlar. Podositlerin hücre gövdeleri ve bazal membran üzerine oturan düzenli bir biçimde yer alan ayaklı çıkıntıları mevcuttur. Ayaklı çıkıntıların birbirine bağlanması SD ile sağlanır. Podosit yapısında bulunan çeşitli proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, podosit yapısını bozarak protein geçirgenliği artışı ve NS'ye yol açar. Bu mutasyonlar SD proteinleri nefrin ve podosin (NPHS1 ve NPHS2), aktin iskelet proteinleri (ACTN4 ve INF2), nükleer proteinler (WT1), mitokondriyal proteinler (COQ2) ile adezyon ve glomerüler

bazal membran proteinleri [(tip IV kollajen (COL4A3, COL4A4, COL4A5) ve laminin (LAMB2)] proteinlerindeki mutasyonlardır.

MDH'de de, elektron mikroskopik incelemesinde podosit ayaksı çıkıntılarının düzeninin bozularak değiştiği ve birbirleri ile kaynaştıkları görülür. Ancak bu hastalarda podositlerdeki yapısal bozukluğa yol açan temel sebep ve patogenez tam olarak anlaşılammıştır (15).

#### b) İmmün mekanizmalar

İNS patogeneziyle ilgili birkaç kanıt dizisi, immun sistemin genetik olmayan İNS'de önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bunlardan en önemlisi hücre aracılı immunosupresyona dayalı tedavinin etkinliğidir (23). Ayrıca hücre aracılı immunosüpresyona yol açan kızamık hastalığı sonrasında remisyona giren vakaların saptanması, hodgkin lenfoma hastalığına eşlik edebilmesi, MDH'li hastaların biyopsilerinde immun depolanma olmaması hastalığın patogenezinde T hücre fonksiyonlarındaki bozukluğun rol aldığını düşündürmektedir (15, 27). Ayrıca son zamanlarda yapılan çeşitli araştırmalarda da MDH'nin aktif döneminde T hücre alt grupları arasındaki dengenin bozulmuş olduğu gösterilmiştir (28).

Son yıllarda, B hücrelerini baskılayan CD20 monoklonal antikor rituksimab'ın çeşitli tipte NS'lerin tedavisinde yararlı olduğu görülmüştür. Bu gözlemlerle beraber hastalığın patogenezinde B hücrelerinin rolü olduğu düşünülmüştür. Öte yandan in vitro koşullarda rituksimab'ın podositlerde SMPDL-3b'ye direkt olarak bağlandığının gözlenmesiyle antiproteinürik etkisinin B hücre etkisinden bağımsız olabileceği öne sürülmüştür (15, 29).

#### c) Dolaşan faktörler

FSGS'li hasta serumlarının deney hayvanlarında kullanımıyla proteinürinin ortaya çıkması, plazma değişiminin tedavide etkili olması gibi bulgular sistemik dolaşımda bulunan bazı faktörlere dikkati çekmiştir. Başka bir çalışmada ise bir plazma proteini olan hemopeksinin podosit sitoskeletonuna bağlanarak ayaksı çıkıntılarının kaybına sebep olup proteinüriye yol açtığı bildirilmiştir (15, 30). FSGS'li hastaların serumundan izole edilen cardiotrophin-like cytokine 1'in (CLC-1) deneysel çalışmalarda glomerüler permeabilityyi arttırdığı ve nefrin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (15, 31). Son yıllarda çok tartışılan ve dikkat çeken bir faktör olan dolaşım faktörü olarak

adlandırılan urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve nefrotik sendromla ilişkilendirilmiştir (15, 32, 33).

#### 2.2.4. Klinik belirtiler, bulgular ve laboratuvar incelemeleri

Nefrotik sendromda, hastalar genellikle ödem nedeniyle başvururlar. Ödem daha çok periorbital bölgede başlayıp, sonrasında alt ekstremitelerde ve labial veya skrotal bölgede ödem şekline dönüşür. Daha ileri vakalarda asit, plevral ve perikardiyal sıvı birikimi ile anazarka tarzı ödem görülebilir. Bazı hastalar ise aktif şikayetleri olmadan rutin idrar incelemesinde nefrotik düzeyde proteinüri saptanarak tanı alabilirler. Hastaların öykülerinde çoğu zaman geçirilmiş üst solunum yolu enfeksiyonu öyküsü mevcuttur (19).

Anazarka ödemli hastalarda akciğerlerde sıvı birikimine bağlı solunum sıkıntısı gelişebilirken perikardiyal efüzyon kalp yetmezliği bulgularına ve hipoperfüzyona sebep olabilir. Hiperkoagülabilitateye bağlı gelişen venöz ve arteriyel tromboembolizm, başta ağrı olmak üzere farklı klinik bulgulara yol açabilir. Klinik tabloya sepsis, pnömoni, peritonit gibi enfeksiyöz komplikasyonlar eşlik edebilir. Hastalarda genellikle oligüri saptanırken bazı vakalarda kliniğe hipertansiyon da eklenebilir (19).

Nefrotik sendromlu hastalar için önerilen laboratuvar testleri ve araştırmalar tablo 2 içerisinde özetlenmiştir.

<i>Tablo 2: Nefrotik sendromlu çocukların araştırılması (15-17)</i>
<b>Birinci basamak araştırmalar</b>
<input type="checkbox"/> Tam idrar tetkiki
<input type="checkbox"/> Kantitatif proteinüri tayini Spot idrarda protein/ kreatinin oranı 24 Saatlik idrar biriktirilmesi
<input type="checkbox"/> Tam kan sayımı
<input type="checkbox"/> Böbrek fonksiyon testleri (kanda üre ve kreatinin)
<input type="checkbox"/> Serum elektrolitleri
<input type="checkbox"/> Serumda total protein, albümin, immunoglobulinler
<input type="checkbox"/> Kan lipid profili
<input type="checkbox"/> Serum kompleman 3 ve 4 düzeyleri
<input type="checkbox"/> PPD testi
<input type="checkbox"/> Akciğer grafisi
<b>Gerekli hallerde yapılacak ek incelemeler</b>
<b>Sistemik/otoimmün hastalıklar için:</b>
<input type="checkbox"/> Antinükleer antikorlar (ANA)
<input type="checkbox"/> Anti-çift sarmallı DNA antikorları (Anti-ds DNA)
<input type="checkbox"/> Anti-nötrofil sitoplasmik antikorlar (ANCA)
<b>Enfeksiyon hastalıkları araştırılması</b>
<input type="checkbox"/> B ve C hepatiti
<input type="checkbox"/> HIV
<b>Genetik testler</b>
<input type="checkbox"/> Doğumsal ve infantil nefrotik sendrom
<input type="checkbox"/> Ailede nefrotik sendrom
<input type="checkbox"/> Sendromik hastalar
<input type="checkbox"/> Steroide dirençli nefrotik sendromlu hastalar
<b>Biyopsi</b>
<input type="checkbox"/> 12 yaşından büyük hastalar
<input type="checkbox"/> Eşlik eden nefritik bulgular
<input type="checkbox"/> Hipokomplementemi
<input type="checkbox"/> Steroide dirençli nefrotik sendromlu hastalar

Tam idrar tetkikinde üç +++ veya dört ++++ proteinüri saptanır. MDH'de, hastaların %20 kadarında geçici mikroskobik hematüri de saptanabilirken diğer nedenlere bağlı nefrotik sendromlarda (özellikle FSGS, primer ve sekonder glomerülofritler) makroskobik veya mikroskobik hematüri sık görülür. Proteinürinin kantitatif araştırılmasında nefrotik düzeyde proteinüri bulunur (15, 19).

Kan biyokimyasında saptanan en önemli bulgu hipoalbuminemidir. Serum albümin düzeyinin 3g/dL (bazı kaynaklara göre 2.5g/dL) altında bulunması NS'yi tanımlar (15, 17). Hiperlipidemi; lipid klirensinin bozulması ve lipoproteinlerin taşıyıcı proteinlerinin kaybı sonucu oluşur (34-36). NS'de serum kreatinin seviyesi çoğunlukla normaldir. Ancak MDH'de hipoalbuminemi nedeniyle gerçekleşen böbrek perfüzyon bozukluğuna bağlı prerenal böbrek hasarı ve ılımlı glomerüler filtrasyon hızı (GFR) düşüşü görülebilir. Yine kapiller geçirgenlikteki değişikliklerin de akut böbrek hasarına katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (36, 37). Hemokonsantrasyon nedeniyle hemoglobin ve trombosit değerlerinde yükselme saptanabilir. İdiyopatik ve genetik NS'de serum kompleman 3 ve 4 (C3 ve C4) düzeyleri normal sınırlarda saptanır. Postenfeksiyöz glomerülofritlerde ve MPGN'de C3 düşükken SLE'de hem C3 hem de C4 düzeyleri düşüktür. Akciğer grafisi plevral effüzyon, akciğer ödemi ve sistemik hastalıkların akciğer tutulumu açısından yol göstericidir.

Birinci basamaktaki bu incelemelere ek olarak, genetik NS düşünülen hastalara genetik tetkikler, sekonder NS'de altta yatan hastalığa yönelik tetkikler ve gerektiği zaman biyopsi yapılır. Bir yaşından küçük NS'li çocuklarda kalıtsal NS'ler daha sıktır. Bu hastalara tanı konulduğunda başlangıçta genetik test yapılması önerilir. Ayrıca ailesinde NS tanımlanan, fizik muayenesinde sendromik bulgular mevcut olan steroide dirençli olgularda da genetik test yapılmalıdır.

Biyopsi ile membranöz nefropati (MN) tanısı konulduğu durumda hepatit B ve C serolojilerinin araştırılması ve son yıllarda primer membranöz nefropati patogenezinde rol oynadığı gösterilmiş olan fosfolipaz A2 reseptör (PLA2R) antikoru tayini önem kazanır (15, 16).

### **2.2.5. Böbrek biyopsi endikasyonları**

Çocuklarda renal biyopsi işlemi, 1961'den itibaren açık operasyon kullanılarak yapıyorken, 1970 yılında Metcoff modifiye iğne biyopsisini tanımlamıştır (38, 39).

Bugün perkutanöz renal biyopsiler ultrasonografi eşliğinde güvenilir bir yöntemle rutin prosedürler kullanılarak yapılmaktadır.

Böbrek biyopsisi İNS’de şart değildir ancak başlangıçta MDH’de beklenen klinik seyir dışında bulgular varsa biyopsi yapılır (40). Hastalığın başlangıcında böbrek biyopsi endikasyonları tablo 3’te verilmiştir.

<i>Tablo 3: Başlangıçta böbrek biyopsisi yapma endikasyonları (40)</i>
<1 yaş veya >16 yaş
Pozitif aile öyküsü
Makroskopik hematüri, devam eden mikroskopik hematüri, C3 düşüklüğü
Ciddi hipertansiyon
Böbrek yetmezliği (hipovolemiye bağlı olmayan)
Böbrek dışı bulgular (artrit, döküntü, anemi)
Kronik hastalık varlığı

Ayrıca, steroide dirençli olgularda diğer immunsupresif ilaçlarla tedavi öncesi ve tedaviye devam edildiği süre boyunca 2 yılda bir böbrek biyopsisi yapılır (40). Doğru değerlendirme için biyopsi örneğinin en az 10 glomerül içermesi tanı için gereklidir. Ayrıca alınan örnek ağırlıklı olarak korteks ve bir miktar da medullayı içermelidir. Bununla beraber fokal lezyonlar için (FSGS) en az 25 glomerül içermeli ve FSGS en erken jukstamedüller glomerüllerde ortaya çıktığından bu bölgeyi de içermesine özen gösterilmelidir (41).

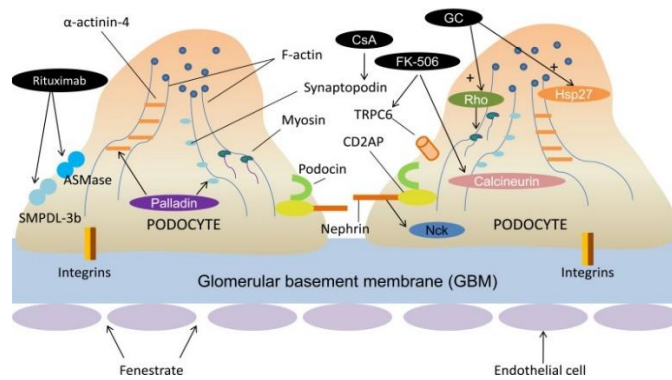
Biyopsi bulguları MPGN ile uyumlu olduğunda kronik enfeksiyon ve otoimmün hastalıklar akla gelmelidir. İmmünfloresan boyama C3 glomerülopatisi ile uyumlu ise etyolojide kompleman sistemi proteinleri ile ilgili mutasyonlar ve kompleman sistemi proteinlerine karşı antikolar araştırılır (15, 16).

### **2.3. Nefrotik sendromda tedavi**

Nefrotik sendromlu çocukların %80’i MDH olup SSNS grubuna girmektedir (2, 6). SSNS’li hastaların %40’ı ise steroid bağımlı ya da sık relaps grubundadır. Kalan %10-20 hasta ise SRNS olup bu hastaların patoloji sonuçları FSGS ile uyumlu gelir. SRNS’li (FSGS) hastaların en büyük riskleri ise kortikosteroid yanında diğer immünsüpresiflere de dirençlerinin olması ve bir kısmının KBH’ye ilerlemesidir (5, 6) (Tablo 4).

Tablo 4: Nefrotik sendromda tanımlar (5, 42-48)	
Nefrotik Sendrom	Yaygın ödem Nefrotik düzeyde proteinüri: - >40 mg/m <sup>2</sup> /saat (veya 50 mg/kg/gün) veya - spot idrar protein/kreatinin oranı >2 g/g Hipoalbüminemi (<2.5 g/dl dL) olması
Tam remisyon	3 ardışık günde idrarda protein <4 mg/m <sup>2</sup> /saat veya idrar dipstik ile <1+ olması
Parsiyel remisyon	Proteinüri oranında %50 veya daha fazla azalma ve spot idrar protein/kreatinin oranı 0,2-2 g/g
Tedaviye yanıtız	Bazal proteinürininin %50 azaltılamaması veya persistan spot idrar protein/kreatinin oranı >2 g/g
Steroid yanıtlı	4 haftalık kortikosteroid tedavisi ile tam remisyon sağlanması
Steroid dirençli	8 haftalık kortikosteroid tedavisine rağmen tam remisyon sağlanamaması
Relaps	Spot idrar protein/kreatinin oranı >2 g/g veya idrar dipstik ile 3+ protein
Seyrek relaps	Başlangıç tedavisine yanıtından sonraki ilk 6 ay içinde 1 relaps veya ilk 1 yıl içinde 1 ila 3 arasında relaps
Sık relaps	Başlangıç tedavisine yanıtından sonraki ilk 6 ay içinde 2 veya daha fazla relaps veya ilk 1 yıl içinde 4 veya daha fazla relaps
Steroid bağımlı	Kortikosteroid tedavisi sırasında veya tedavi kesildikten sonra 14 gün içinde 2 ardışık relaps gelişmesi
Geç direnç	Bir veya daha fazla remisyon sonrası ≥4 hafta kortikosteroidle rağmen persistan proteinüri olması

Tedavide amaç belirtilerin kontrol altına alınarak en kısa zamanda iyileşmenin sağlanması, tekrarların önlenmesi ve tedavinin yan etkilerinin en az düzeyde tutulmasıdır. Hastaların çoğu steroid duyarlı olduğundan tedavide ilk olarak oral kortikosteroidler başlanır ve remisyona girmesi beklenir (2). Ancak steroid duyarlı NS'li hastaların bir kısmı sık relaps ve bağımlı NS olup steroid ve yan etkilerine uzun süre maruz kalırlar. Bu nedenle, alkilleyici ajanlar, KNİ, MMF ve Rituksimab dahil olmak üzere diğer immünespresif ajanlar, bu tür çocuklarda remisyon sağlamak için kullanılır (3, 4). KNİ'ler, SRNS'yi tedavi etmek için kullanılan ana immünespresif ajanlardır. KNİ'lere yanıt vermeyen çocuklar için MMF, rituksimab gibi ek alternatif ajanlar sıklıkla kullanılır (7) (Şekil 4).



Şekil 4: Nefrotik sendrom tedavisinde kullanılan immünespresif ilaçların etki mekanizmaları (49)

### 2.3.1. İmmünespresif tedavilerin etki mekanizmaları

#### 2.3.1.1. Kortikosteroidler

Steroid tedavisi NS tedavisinde büyük yer tutmasına karşın etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak temel etkisi bazı sitoplazmik reseptörlere bağlanarak

protein sentezini ve transkripsiyonunu modifiye etmek, böylece inflamatuvar reaksiyonları ve humoral immun yanıtları baskılamaktır. Steroidler İNS’de ilk tercih edilen ilaç olup, hastaların %80’inde etkindir. Yine SRNS hastalarında da intravenöz pulse metilprednizolon (PMP) tedavisinin hem tek başına hem de diğer immunsupressif tedaviler ile birlikte etkinliğini gösteren gözlemsel çalışmalar vardır (50-52). Ancak bazı çalışmalarda ise PMP kullanımı ile ilgili yüksek doz steroidin uzun süre kullanımının ciddi yan etkilere yol açacağı belirtilmiştir (43, 50).

Bilindiği üzere uzun süreli steroid tedavisinin birçok yan etkileri vardır ve bu durum SBNS olan çocuklarda sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Klinik pratikte sık karşımıza çıkan yan etkiler hipertansiyon, katarakt, glokom, akne, obezite ve davranış bozuklukları olarak sayılabilir (42).

### **2.3.1.2. Alkilleyici ajanlar**

Alkilleyici ajanlar olan siklofosamid veya klorambusilin, sık relaps ve steroide bağımlı SSNS tedavisinde kortikosteroidden koruyucu ajan olarak kullanılması önerilmektedir. Siklofosamid tedavisinin kemik iliği depresyonu, hemorajik sistit, gastrointestinal rahatsızlıklar, alopesi ve enfeksiyon gibi yan etkileri görülebilmektedir. Uzun süreli kullanımında ise malignite, pulmoner fibrozis ve sterilite gibi yan etkiler görülebilir. Özellikle erkek çocuklarda gonadotoksik olduğu bilinmektedir. SSNS tedavisinde sık kullanılmasına karşın SRNS hastaları için etkinliği oldukça azdır

Klorambusil tedavisi ile nöbet, enfeksiyon, malignite gelişimi gibi yan etkiler görülebilirken lökopeni ve trombositopeni gibi yan etkiler doz azaltımı ile 1-3 hafta içinde düzelir. Ayrıca uzun süreli tedavi verilen hastalarda malignite veya lösemi gelişme riski vardır.

Tedavilerin kemik iliği yan etkileri geri dönüşlü iken her iki tedavinin özellikle erkek çocuklarda gonadotoksik etkileri olup azospermiye yol açtığı bilinmektedir (53). Azospermi geri dönüşsüzdür. Bu nedenle siklofosamid (168 mg/gün) ve klorambusilin (11,2 mg/kg/gün) kümülatif dozları dikkatli hesaplanmalıdır (42, 54).

### **2.3.1.3. Levamizol**

Levamizol immun modülatör etkileri olan antihelmintik bir ajandır ve SSNS tedavisinde kortikosteroidden koruyucu bir ajan olarak kullanımı Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) kılavuzunda önerilmektedir (42, 43). Levamizol



yan etkileri arasında nötropeni, agranülositoz, kusma, kutanöz döküntü ve vaskülitin yanı sıra uykusuzluk, hiperaktivite ve nöbet gibi nörolojik semptomlar da bulunmaktadır. Ancak ilaç pek çok ülkede mevcut değildir.

#### **2.3.1.4. Kalsinörin inhibitörleri**

KNİ olan siklosporin ve takrolimus SRNS tedavisinde kullanılan temel ilaçlardan olmalarının yanı sıra kortikosteroidden koruyucu ajanlar olarak sık relaps ve steroide bağımlı NS tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilaç grubu iki mekanizma ile antiproteinürik etki gösterir: 1) Lenfositlerde T hücre sinyalinin inhibisyonu ve böylece podositlerde yer alan sinaptopodin üzerinden etki etmesi 2) Podosit aktin hücre iskeletine non-immun etki ile fayda sağlaması (42, 43).

Siklosporinin hipertrikoz, diş eti hiperplazisi gibi kozmetik yan etkileri fazla olduğundan, siklosporin yerine takrolimus kullanımı önerilmekte ve kullanımı artmaktadır (42, 55). Ancak her iki ilaç ta hipertansiyon, böbrek fonksiyon bozukluğu, böbrekte interstisyel fibrozis ve diyabetes mellitus gelişimi gibi yan etkilere neden olabilir (42, 56). Son yapılan bazı çalışmalarda ise nefrotoksisite göz önüne alındığında, takrolimus tedavisinin siklosporin tedavisine göre daha düşük riskli olduğu öne sürülmüştür (57).

#### **2.3.1.5. Mikofenolat mofetil (MMF)**

MMF pürin biyosentezinde rol alan inozin monofosfat dehidrogenazı inhibe ederek etki eder. Bu enzim pürin biyosentezinde yer alan anahtar bir enzimdir. Bu baskılama sayesinde T ve B hücrelerinde DNA replikasyonu inhibe olur.

SSNS tedavisinde kortikosteroid koruyucu bir ajan olarak kullanımı önerilmektedir. KDIGO klavuzunda steroid ve KNİ dirençli hastalarda kullanılması önerilmektedir ancak SRNS hastalarında etkinliği az hasta sayılı gözlemsel çalışmalara dayanmaktadır. Son yıllarda rituksimab tedavisi uygulanan hastalarda MMF'in ilave bir ajan olarak verilebileceğini öneren çalışmalar vardır (58). Az sayıda çocukta gastrointestinal semptomlar ve lökopeni gibi yan etkiler görülmektedir.

#### **2.3.1.6. Monoklonal antikolar**

**Ritüksimab**; bir kimerik CD20 monoklonal antikordur. Temel etki mekanizması CD20'yi hedefleyerek B hücre deplesyonu yapmasıdır (42, 56). Bu çok bilinen immün

etkisi dışında podosit fonksiyonları üzerinden de etki etmektedir. Yakın zamanda sfingolipid metabolizmasındaki önemli yolaklarda görev alan ASMase ile aynı homolojiye sahip bir protein olan SMPDL-3b ekspresyonunun, FSGS'li hastalarda azaldığı gösterilmiştir (59). Diğer birçok bir çalışmada ise, Rituksimab'ın podositlerde SMPDL-3b'nin ekspresyonunda down regülasyonu engellediği saptanmıştır (59, 60). Bu çalışmalar, SMPDL-3b seviyelerindeki değişikliğin çeşitli renal glomerüler hastalıklarda podosit fonksiyonunu etkilediğini ve rituksimab tedavisi konusunda SMPDL-3b'nin yol gösterici olabileceğini düşündürmektedir.

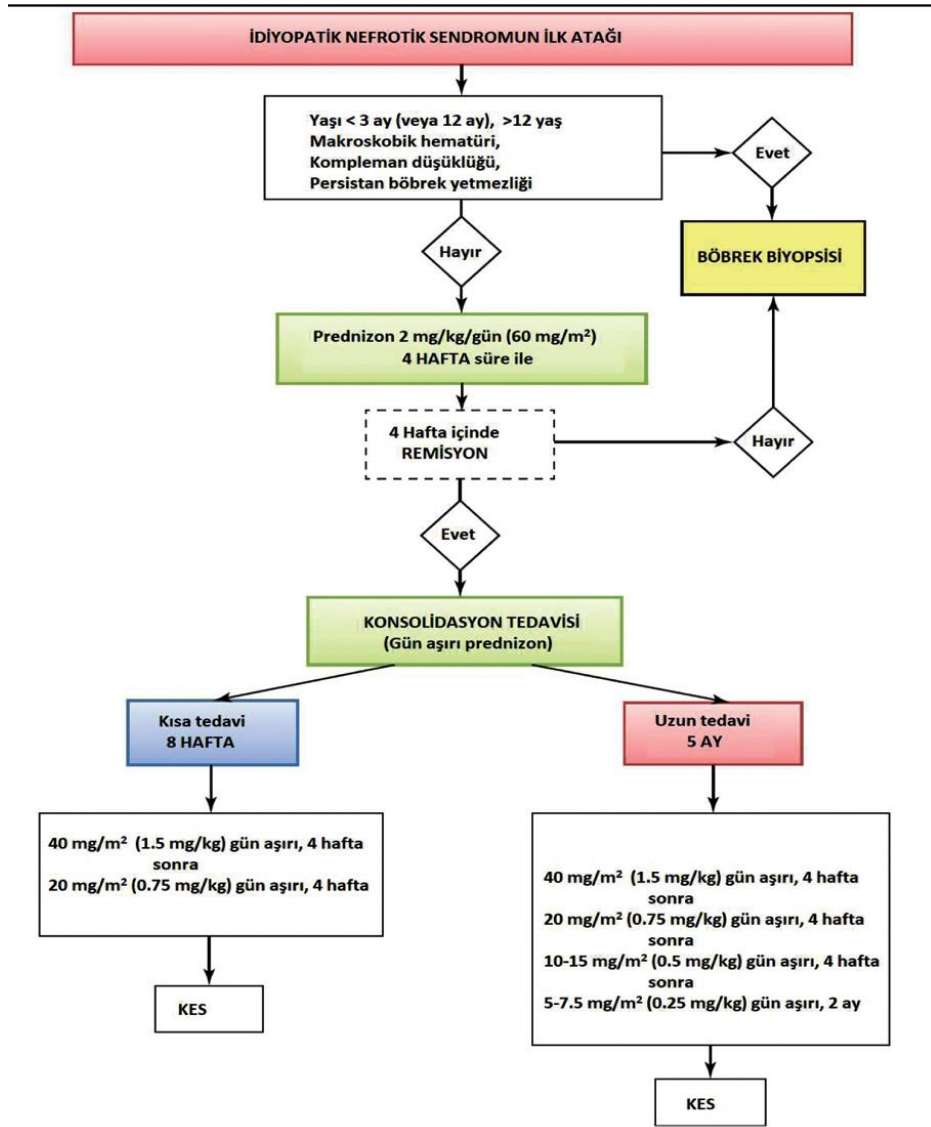
NS'de 2000'li yılların başlarından beri kullanılan bu tedavi özellikle SSNS hastalarında daha başarılı olsa da, SRNS'li hastaların bir kısmında da başarılı sonuçlar bildirilmiştir (61).

Ritüksimab klinikte genellikle güvenilir ve tolere edilen bir ilaçtır. Hastaların yaklaşık üçte birinde ateş, kusma, deri döküntüsü, bronkospazm gibi akut reaksiyonlara neden olurken potansiyel yan etkileri arasında hipogamaglobulinemi, geç başlangıçlı nötropeni, Hepatit B reaktivasyonu, ciddi infüzyon ilişkili advers olaylar, Pneumocystis jiroveci pnömonisi, pulmoner fibrozis ve enfeksiyonlar bulunmaktadır (42, 62). Özellikle hematolojik yan etkiler küçük çocuklarda daha sık ve ciddi olarak karşımıza çıkmaktadır (50, 63).

**Ofatumumab;** Son dönemde SRNS tedavisinde gündeme gelen bir diğer monoklonal CD20 antikorudur. Humanize bir CD20 antikorudur ve rituksimab antikoruna gelişmiş veya rituksimab hipersensitivitesi olan hastalarda alternatif bir tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır (50).

### **2.3.2. Nefrotik sendromda ilk atak tedavisi**

SSNS tedavisinde ilk olarak oral kortikosteroidler (prednizon veya prednizolon) önerilir. Oral steroid dozunun günlük tek dozda 60 mg/m<sup>2</sup>/gün veya 2 mg/kg/gün olarak maximum 60 mg/gün olacak şekilde başlanması önerilmektedir. Tedavi protokolünde günlük oral steroid tedavisi 4-6 hafta verildikten sonra tedaviye cevap alındı ise 40 mg/m<sup>2</sup> veya 1,5 mg/kg (Max 40 mg/gün) günün devam edilerek 2-5 ayda azaltılarak kesilmelidir (42, 46) (Şekil 5).

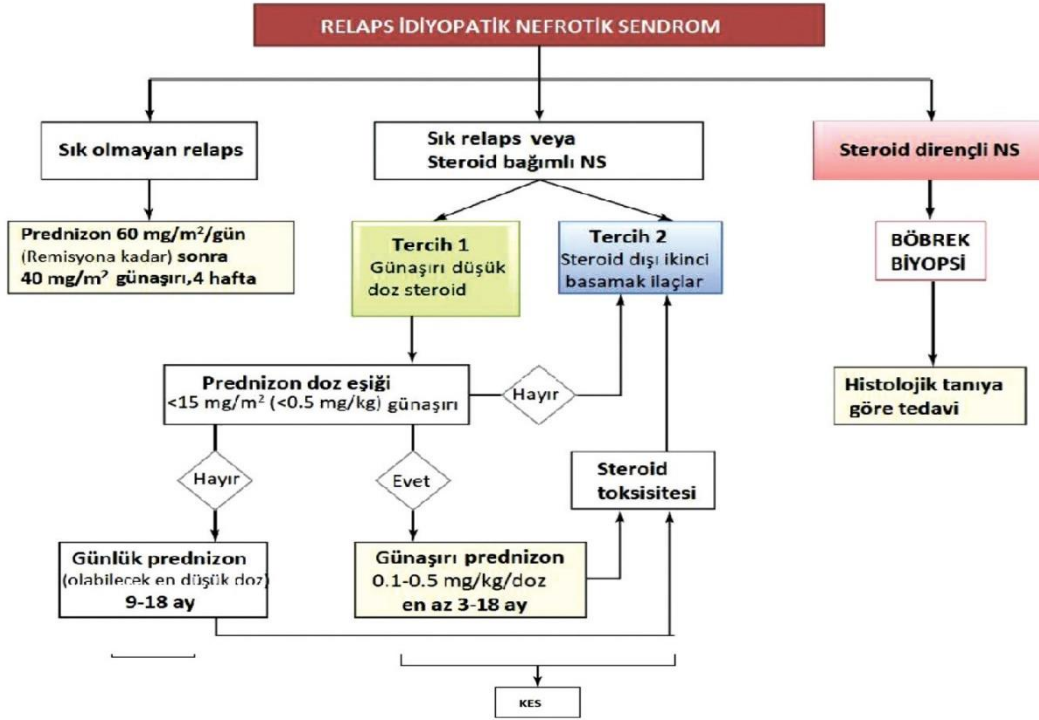


Şekil 5: İdiyopatik nefrotik sendrom ilk atak tedavi algoritması(64)

### 2.3.3 Steroide duyarlı nefrotik sendromda relaps tedavisi

SSNS tanılı çocuklarda %80-90 oranında bir veya daha fazla nüks görülmektedir (65). Relaps olan hastaların yaklaşık yarısı seyrek relaps grubunda iken, geri kalan kısmı sık relaps veya steroide bağımlı SSNS grubundadır.

Çocuklarda seyrek görülen SSNS relaps grubunda, çocuk en az 3 gün boyunca tam remisyonda olana kadar  $60 \text{ mg/m}^2$  veya  $2 \text{ mg/kg}$  (Maximum  $60 \text{ mg/gün}$ ) günlük doz steroid ile tedavi edilmesi önerilmektedir. Bu hastalarda tam remisyona sağlandıktan sonra günde 40  $\text{mg/m}^2$  veya  $1,5 \text{ mg/kg}$  (Maximum  $40 \text{ mg}$ ) tek doz olarak 4 hafta süreyle steroid tedavisi uygulanmalıdır. Sık relaps ve steroide bağımlı NS'li çocuklarda relapsların günlük steroid ile en az 3 gün remisyona sağlanana kadar tedavi edilmesi ve ardından 3 ay boyunca günde steroid olarak verilmesi önerilmektedir (42, 66) (Şekil 6).

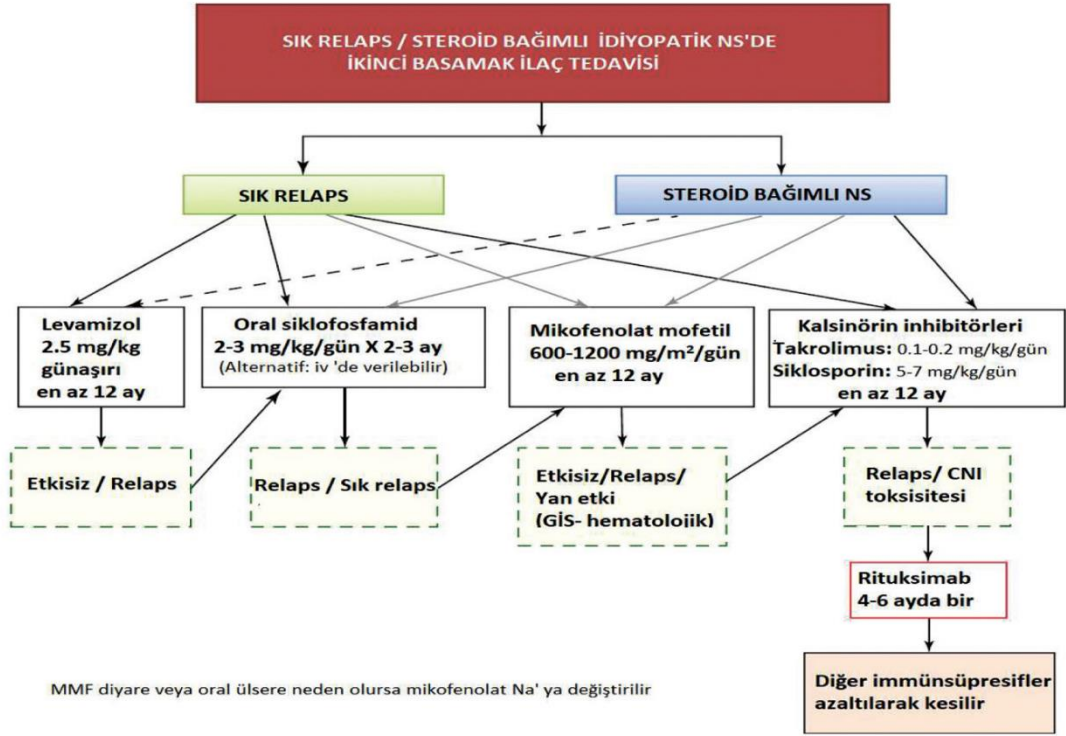


Şekil 6: İdiyopatik nefrotik sendromda relaps tedavisi (64)

Sık relaps ve steroide bağımlı NS'li çocuklarda remisyonu sürdürmek için önemli bir yan etki gelişmediği sürece steroidin en düşük dozda (eşik doz <0,5 mg/kg veya 15 mg/m<sup>2</sup>) gūnaşırı verilmesi önerilir. Gūnaşırı tedavinin etkili olmadığı durumlarda ise remisyonu sürdürmek için majör yan etkilerin görülmediği en düşük dozda günlük steroid verilmesi önerilmektedir (42, 43).

#### 2.3.4. Sık relaps ve steroide bağımlı NS tedavisinde steroidden koruyucu ajanlar

Sık relaps veya steroide bağımlı NS'li çocuklarda steroid yan etkilerin görülmesi hekimleri farklı tedavi arayışlarına yönlendirmiştir. Kümülatif steroid dozunu azaltarak bu hastaları steroid yan etkilerinden korumak amacıyla kortikosteroidden koruyucu ajanlar kullanılmaktadır. Bu grupta alkilleyici ajanlar (siklofosamid, klorambusil), levamizol, KNİ (siklosporin, takrolimus), MMF ve rituksimab tedavileri bulunmaktadır (42) (Şekil 7).



Şekil 7: Sık relaps veya steroide bağımlı nefrotik sendromda tedavi algoritması(64)

**Alkilleyici ajanlar** olan siklofosamid ve klorambusilin, sık relaps ve steroide bağımlı SSNS tedavisinde kortikosteroidden koruyucu olarak kullanılması önerilmektedir.

KDIGO Çalışma Grubu siklofosamid 2 mg/kg/gün dozda 8-12 hafta süreyle (maximum kümülatif doz 168 mg/kg) verilmesini önermektedir (4, 42). Siklofosamid tedavisine alternatif olarak klorambusil 0,1-0,2 mg/kg/gün dozunda 8 hafta süreyle (maximum kümülatif doz 11.2 mg/kg) verilebilir. Alkilleyici ajanların ikinci kez verilmesi önerilmemektedir (42, 44). Bu hasta grubunda klorambusil ve siklofosamidin birbirlerine üstünlükleri bulunmamıştır. Sık relaps ve bağımlı SSNS'de siklofosamid ve steroid etkinliğini karşılaştıran bir çalışmada siklosporin grubunda relapsın daha az görüldüğü saptanmıştır (57).

**KNİ** olan siklosporin ve takrolimus KDIGO rehberinde kortikosteroidden koruyucu ajanlar olarak önerilmektedir. Siklosporin tedavisinin 4-5 mg/kg/gün iki doza bölünerek verilmesi önerilmektedir. KNİ kesildiğinde çoğu çocukta nüks geliştiğinden en az 12 ay süreyle tedaviye devam edilmelidir (42, 43). Gözlemsel çalışmalardan elde edilen verilerde alkilleyici ajan tedavisinden sonra relaps olan SBNS'li çocukların siklosporin tedavisi ile %60-90'ında remisyona sağlandığı bildirilmiştir (67, 68).

Siklosporin tedavisinde de hastaların çoğunda doz azaltıldığında veya kesildiğinde relaps bildirilmektedir (42, 69). Sonuç olarak steroid tedavisine olduğu gibi hastalar siklosporine de bağımlı hale gelebilirler (42, 68).

SSNS’de takrolimus kullanımını destekleyen sınırlı miktarda veri bulunmaktadır. Siklosporinin hipertrikoz, diş eti hiperplazisi gibi yan etkilerinin olması nedeniyle takrolimus kullanımını artmaktadır (42, 55). Siklosporinin bu tür kozmetik yan etkileri fazla olduğunda, siklosporin yerine takrolimusun 0,1 mg/kg/gün iki dozda kullanılması önerilmektedir.

KNİ ile tedavi süresi konusunda tam bir uzlaşma yoktur. Bazı yazarlar böbrek fonksiyonları ve histoloji üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle KNİ tedavisinin 2 yıl ile sınırlandırılmasını önermekteyken; iki yılın üzerinde kullanılması gerekiyorsa böbrek biyopsisi yapılması önerilmektedir (42, 56).

**MMF** steroid bağımlı ya da sık relaps SSNS tedavisinde kortikosteroid koruyucu bir ajan olarak kullanılabilir. MMF kesildiğinde çoğu çocukta relaps ortaya çıktığından, MMF’nin (başlangıç dozu 1,200 mg/m<sup>2</sup>/gün, iki dozda) en az 12 ay boyunca verilmesi önerilmektedir (42, 43). Bu hasta grubunda MMF ve siklosporinin karşılaştırıldığı bir çalışmada siklosporinin remisyonu sürdürmede daha başarılı olduğu ancak böbrek fonksiyonlarını korumada MMF’in daha başarılı olduğu bulunmuştur (70, 71).

**Rituksimab;** son zamanlarda steroid ve steroidden koruyucu ajanların optimal kombinasyonlarına rağmen sık relaps veya tedavilerin ciddi yan etkilerinin ortaya çıktığı SBNS’li hastalarda önerilmektedir (42, 43). Genellikle uygulanan protokol 375 mg/m<sup>2</sup>/hafta 4 doz şeklinde olsa da CD19 düzeylerine bakılarak CD19 depleasyonu sağlandığında 1 ya da 2 doz veren merkezler de vardır (72). Yapılan çalışmalarda bu hasta grubunda remisyon sağlandıktan sonra uzun süre relaps gelişmediği gösterilmiştir (2, 3, 73, 74).

### **2.3.5. Steroide dirençli nefrotik sendrom tedavisi**

SRNS tanısı için literatürde farklı tanımlamalar mevcuttur. Bazı yazarlar 60 mg/m<sup>2</sup>/gün dozunda 4 hafta prednizolona rağmen remisyona girememeyi SRNS olarak tanımlarken bazı yazarlar ise prednizolonun 6-8 hafta 60 mg/m<sup>2</sup>/gün dozunda kullanmanın yanısıra intravenöz bolus steroid tedavisine rağmen remisyon sağlanamaması olarak tanımlamaktadır. Bazı kaynaklarda ise SRNS 4 hafta 60

mg/m<sup>2</sup>/gün dozunda steroidi takiben 3 gün 1000 mg/m<sup>2</sup>/gün intravenöz metilprednizolon pulse tedavisine rağmen remisyona sağlanamaması olarak tanımlanmaktadır (50, 75-78). SRNS'nin %10-30'unda podosin ilişkili genlerde mutasyon saptanır. Mutasyon saptanmayan hastaların %50-70'inde KNİ ile remisyona sağlanılır. En az 6 ay boyunca KNİ kullanımına rağmen kısmi ya da tam yanıt sağlanamamasına KNİ dirençli nefrotik sendrom denir. Steroid dışında KNİ ve başka bir steroidten koruyucu ilaçla en az 12 ay tedaviye rağmen remisyona sağlanamaması çoklu ilaca dirençli nefrotik sendrom olarak tanımlanır (78). SRNS'li hastaların %20-40'ı hiçbir tedaviye yanıt vermez ve 10 yıl içinde KBH'ye ilerler (78).

**KNİ'ler** steroid dirençli nefrotik sendrom tedavisinde kullanılan temel ajanlardır. SRNS'li hastalarda yapılan çalışmalarda KNİ tedavisi ile SRNS hastalarının %30-80'ninde parsiyel veya tam yanıt alındığı belirtilmiştir (50, 79, 80). KNİ tedavisinin özellikle steroid tedavisi ile birlikte kullanıldığında etkili olduğu belirtilmiştir. KDIGO çalışma grubu rehberinde KNİ tedavisi SRNS tedavisinde ilk basamak tedavi olarak önerilmiştir. Ayrıca bu rehberde SRNS tedavisinde KNİ ile 6. ayda parsiyel remisyona sağlandığında en az 12 ay devam edilmesi önerilmiştir (21, 50).

SRNS'li çocuklarda siklosporin ve takrolimus tedavilerinden hangisinin daha etkin olduğuna yönelik yapılan çalışmalarda ise her ikisinde de benzer sonuçlar olduğu öne sürülmüştür (50, 81). Uzun süreli KNİ kullanımında akılda tutulması gereken en önemli konu nefrotoksitedir. Yapılan çalışmalarda özellikle 2-5 yıldan daha fazla KNİ kullanımının renal toksisite ile ilişkili olduğu saptanmıştır (50, 63). Altı ay içinde remisyona sağlanan hastalarda 12-24 ay kullanım sonrası KNİ kesilmesi ya da nefrotoksisite riskinin azaltılması için MMF'e geçilmesini öneren yayınlar vardır (78).

**Siklofosfamidin** özellikle SSNS hastalarında remisyona sağladığı ve relapsları azalttığı gösterilmesine rağmen, SRNS hastaları için etkinliği oldukça düşüktür. Siklofosfamid ve siklosporinin karşılaştırıldığı birçok çalışmada siklosporin üstün bulunmuştur. Bundan dolayı KDIGO önerilerinde siklofosfamidin SRNS'li çocuklara verilmemesi gerektiği belirtilmiştir (21, 50).

**MMF**, ağırlıklı olarak SSNS tedavisinde kullanılmakta olup SRNS hastalarında etkinliğiyle ilgili az sayıda gözlemsel çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda tam remisyona oranı %23-62 iken parsiyel remisyona oranı %25-37 olarak tespit edilmiştir (50, 63). MMF kullanımının etkinliğiyle ilgili birçok çalışma yapılmakla beraber genel olarak

bakıldığında MMF'in SRNS hastalarında KNİ monoterapisine göre üstün olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca son yıllarda MMF'in rituksimab tedavisi uygulanan hastalarda ilave bir ajan olarak verilebileceğini öneren çalışmalar vardır (50, 82).

### **2.3.6. Kalsinörin ve steroidde dirençli nefrotik sendromda tedavi seçenekleri**

SRNS'de tedaviyi çoğunlukla KNİ'ler oluşturmaktadır. Bazı hastalar KNİ ile remisyona girerken tedavi dozunun azaltılmasıyla beraber tekrar relaps olmaktadır. Bazı hastalar ise KNİ tedavisine hiç yanıt vermemektedir. KNİ tedavisinin uzun süreli kullanımının nefrotoksisiteye yol açtığı da düşünüldüğünde yeni tedavi seçenekleri gündeme gelmiştir. Bahsedilen ilaçlara karşı dirençli olan SRNS hastaları çocuk nefrologları için çok zor bir hasta grubunu oluşturur. Yakın zamanda etkinliği gösterilen monoklonal CD20 antikorları bu hasta grubunda tedavide yeni bir umut ışığı olmuştur. 2000'li yılların başlarından beri SSNS ve SRNS hastalarının tedavisinde kullanılan bu tedavi özellikle SSNS hastalarında daha başarılı olsa da SRNS'li hastalarda da başarılı sonuçlar bildirilmiştir (61). Son 20 yılda SRNS'li hastalarda da bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda remisyon oranı %18-80 arası bildirilmiştir (50, 73, 82-89).

### **2.3.7. SRNS'li hastalarda kullanılan ek tedaviler ( Renin angiotensin-aldosteron sistem (RAS) inhibisyonu)**

RAS inhibitörleri SRNS tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlardır. Enapril ve ramipril en sık kullanılan etken maddelerdir. Anjiotensin reseptör blokörleri (ARB) NS'de kullanılan diğer ilaçlardır. RAS inhibitörleri ve ARB'nin birlikte kullanılmasının tek başına kullanılmasına üstünlüğü saptanmamıştır (73).

## **2.4. Prognoz**

NS'ye bağlı mortalite immunsupresif ajanların kullanımı ile azalmış olsa da relapslar, enfeksiyonlar ve kullanılan ilaçların yan etkileri halen sorun olmaya devam etmektedir. NS tanısı almış hastalarda hastalığın seyriyle ilgili tahminde bulunmak güçtür. NS'de steroid tedavisine yanıt en iyi prognostik gösterge olarak kabul edilebilir. İlerleyici böbrek hastalığı gelişmesindeki en önemli risk faktörü olarak başlangıçta steroid tedavisine olan yanıtızsızlık gösterilebilir.

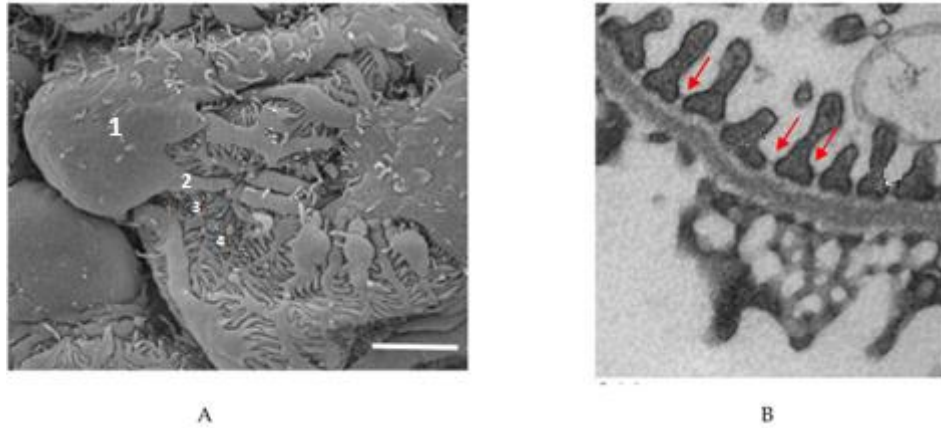
SRNS'li hastaların tedavilerinde uzun süreli ve çok sayıda immunsüpresif tedavi kullanılması gerekebilir. Bu kadar tedaviye karşın bu hastaların diyaliz veya böbrek nakli gerektirecek KBH'ye ilerleme riski yüksektir. FSGS'nin immun formlarında nakil



yapılan böbrekte tekrarlama riski yüksek olmasına rağmen yine de en uygun yaklaşım uygun hazırlık ve önlemlerle böbrek naklidir. Genetik nedenlere bağlı NS'de immunsupresif ilaçların etkili olmaması nedeniyle verilmeleri önerilmez. Bu hastalar hızla KBH'ye ilerlediğinden böbrek nakli en etkin tedavi yöntemidir. Genetik nedenlere bağlı FSGS immun formlarla karşılaştırıldığında hastalığın nakil böbrekte tekrarlama riski oldukça düşüktür (78).

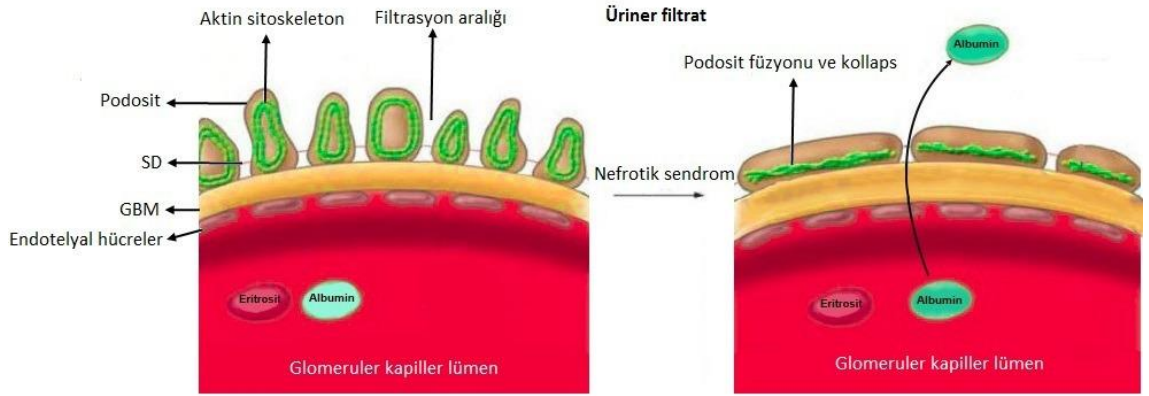
## 2.5. Podosit iskelet yapısı ve tedavi hedeflerindeki yeri

Nefrotik sendrom, glomerüler filtrasyon bariyerinin bir bozukluğudur. Büyük proteinlerin ve makromoleküllerin idrara süzülmesini önleyen GFB'nin filtrasyon mekanizmasının merkezinde ise podosit bulunur (90). Podosit hücre gövdesi ultrafiltrat içinde yüzer ve sadece çıkıntılarıyla GBM'ye bağlanır. Podosit primer çıkıntıları ikincil ve üçüncül çıkıntıları oluşturmak üzere bölünür, nihayetinde komşu podositlerle iç içe geçen ayaklı çıkıntıları oluşur (91-93) (Şekil 8).



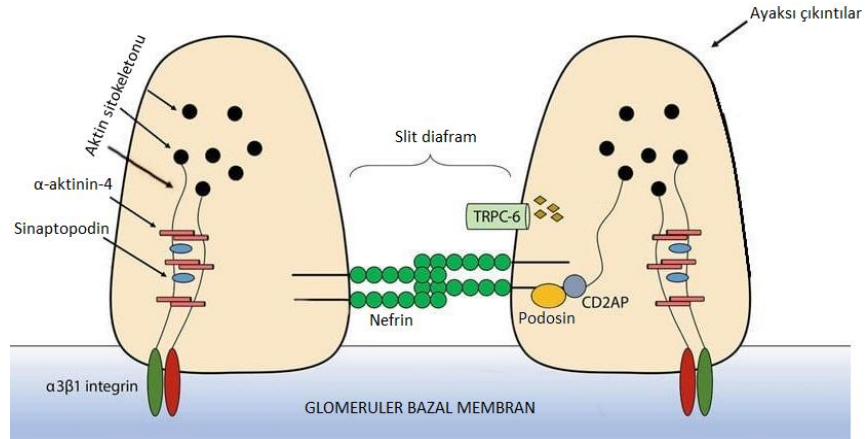
Şekil 8: Podosit yapısı: (A) Bir podositin taramalı elektron mikroskopu görüntüsü. 1-Hücre gövdesi, 2-Primer çıkıntılar, 3-Sekonder çıkıntılar, 4-Ayaklı çıkıntılar. (B) Podosit ayaklı çıkıntılarının arasındaki filtrasyon yarıklarının elektron mikroskopu görüntüsü

Podositler, GFB'nin dış katmanını oluştururlar. Bu hücrelerin glomerül içindeki hemodinamik değişikliklerin oluşturduğu mekanik kuvvetlere karşı dayanıklılığını aktin hücre iskeleti sağlar. Bu nedenle aktin hücre iskeletinin devamlılığı normal podosit fonksiyonu ve GFB'nin bütünlüğünün korunması için kritik öneme sahiptir (94-96). Aktin hücre iskeletinin bozulması podosit füzyonuna sebep olarak proteinüriye yol açar (96, 97) (Şekil 9).



Şekil 9 : Glomerüler filtrasyon bileşenleri ve podosit hasarlanması

**SD**, büyük makromoleküllerin ultrafiltrata süzülmesini önleyen iki ayaklı çıkıntı arasında oluşan seçici bir bariyerdir (98). SD aktin hücre iskeletine bağlanan nefrin ve podosin proteinlerinden oluşurken P-cadherin, zonula okludens-1 (ZO-1) gibi bağlantı proteinlerini de içerir (99). Glomerüler hasardan sonra SD'lerin yerini tight junctionlar (sıkı bağlantı) alır (100, 101).



Şekil 10: Podosit ayak çıkıntıları içindeki makromoleküler kısımlar (102)

SD'nin en önemli yapısal proteini olan nefrin podosin ile etkileşime girerek etki gösterir (103) (Şekil 10). Hücre dışı sinyaller, nefrinin tirozin fosforilasyonu ile aktin çekirdeğine iletilir (99). Nefrin 19q13.1 kromozom bölgesinde bulunan NPHS1 geni tarafından kodlanır. NPHS1 mutasyonu antenatal dönemden itibaren nefrotik düzeyde proteinüriye sebep olur ve bu durum fin tipi konjenital nefrotik sendromla sonuçlanır. Hastalar gelişen fibrotik kalınlaşma ve glomerüler skleroz nedeniyle birkaç yıl içinde KBH'ye ilerler. NPHS1 mutasyonu konjenital nefrotik sendrom hastalarının %40-60'ının nedenidir (95, 101). Bu gendeki mutasyonlar otozomal resesif olarak kalıtılır ve

Finlandiya’da sık görülür. Ülkemizdeki NPHS1 genindeki en sık mutasyonun c.3478C>T (p.Arg1160Ter) olduğu bildirilmiştir (95, 104).

Podosin, nefrinin SD’de yerleşimini sağlayan bir transmembran proteindir ve bu sebeple podosin mutasyonlarında nefrin miktarı da azalır (95, 105) (Şekil 10). Podosini kodlayan gen olan NPHS2’deki mutasyonlar, çocuklarda nefrotik sendromun önemli bir nedenidir (95, 106). Podosin gen mutasyonları KNS’li hastaların %10.6’sında ve daha büyük FSGS’li çocukların %10-40’ında altta yatan nedendir. Türk toplumunda doğu ve güneydoğu Anadolu bölgesinde NPHS2 genindeki en sık görülen mutasyon p.P118L’dir(95, 105).

Nefrin ve podosinin ayaksı çıkıntılarının aktin hücre iskeletlerine bağlanmasında adaptör proteinleri, kritik bir rol oynar (107) (Şekil 10). Bu adaptör proteinlerden CD2-ilişkili protein (CD2AP) hem nefrin hem de podosine bağlanır ve bu proteinleri aktine bağlar (108). CD2AP geninin mutasyonları, İnsanlarda NS ve FSGS lezyonları ile sonuçlanır (109-111).

Sinaptopodin, podosit ayak çıkıntılarında eksprese edilen aktin ile ilişkili bir proteindir (112) (Şekil 10). Sinaptopodin,  $\alpha$ -aktinin-4 üzerindeki etkileri yoluyla aktin aktivitesini düzenler (113).  $\alpha$ -aktininler, aktin filamentlerini çapraz bağlayan ve aynı zamanda bazal membrandaki integrinleri hücre iskeletine bağlayan bir protein ailesidir (114). Podosit ayaksı çıkıntılarında bulunan  $\alpha$ -aktinin-4’ün kaybı, aktin hücre iskeleti ve integrinler arasındaki etkileşimleri bozarak, podositin GBM’ye bağlanma gücünü azaltır (115).  $\alpha$ -aktinin-4’ü kodlayan ACTN4 genindeki mutasyonlar FSGS’ye sebep olur (116-119).

Geçici reseptör potansiyel katyon kanal tip 6 (TRPC6), SD’de podositlerce eksprese edilen selektif olmayan bir katyon kanalıdır (120, 121) (Şekil 10). Podosit ayaksı çıkıntılarında nefrin ve podosin ile etkileşir (95). Podositlerde TRPC6’nın aşırı ekspresyonu, aktin hücre iskeletinin bozulmasına, podositlere artmış kalsiyum girişine ve buna bağlı SD hasarına sebep olur (122). Bu gendeki mutasyonlar daha çok 30-40’lı yaşlarda SRNS’ye neden olur ancak erken çocukluk çağında da SRNS’ye yol açabilir.

Glomerüler bazal membran (GBM); tip IV kollajen ( $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5 izoformları), laminin 521 ( $\alpha$ 5 $\beta$ 2 $\gamma$ 1), entaktin/nidojen ve agrinden oluşur. Podositlerde yer alan temel

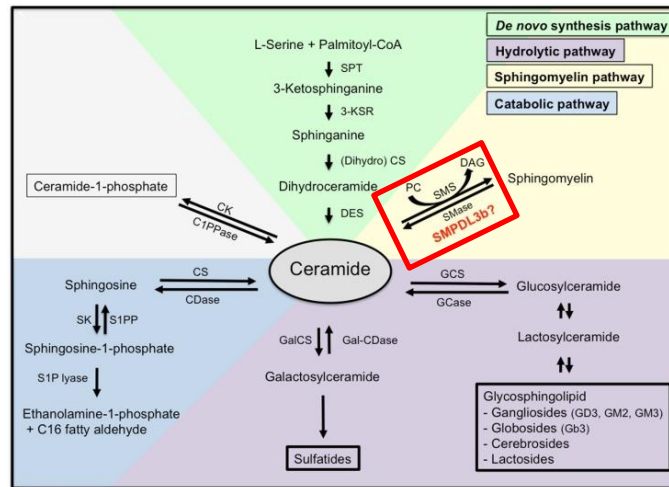
adezyon reseptörü ise integrin  $\alpha3\beta1$ 'dir. Bu reseptör GBM'de yer alan laminin-521'i podositin aktin iskeletine bağlar (123) (Şekil 10).

Podosit aktin yapısının devamlılığında rol oynayan diğer faktörler ise; hemodinamik faktörler, sitokinler (TGF- $\beta1$ , IL-6, Anjiyotensin II (Anj II)), hormonlar, ilaçlar ve sfingolipidlerdir.

## Sfingolipidler

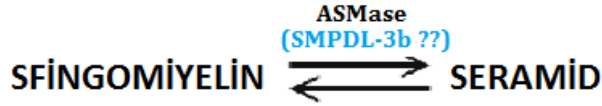
Lipid yapıların, protein etkileşimleri ve sinyal iletimindeki rolleri nedeniyle hücre fonksiyonu için kritik önemi vardır (124). Sfingolipidler, plazma zarlarındaki lipid yapıların önemli bileşenleridir. Plazma zarının akışkanlığı, başta sfingomiyelin olmak üzere sfingolipitler tarafından düzenlenir. Sfingolipit metabolizmasında görevli enzimlerin eksikliği bir veya daha fazla sfingolipit türünün belirli bir organelde birikmesine veya tükenmesine yol açabilir.

Seramidler sfingolipit metabolizmasının merkezi olup aynı zamanda tüm diğer sfingolipitlerin oluşumu için bir öncüdür (Şekil 11). Seramid aynı zamanda hücre büyümesi farklılaşması ve apoptoz gibi hücre fonksiyonların düzenlenmesini sağlayan bir sinyal molekülüdür (124, 125). Seramid, asit sfingomiyelinaz (ASMase) enzimi aracılığıyla sfingomiyelinden elde edilir. Böylece bir yandan seramid sentezlenirken diğer yandan sfingomiyelinin hücre içerisinde birikimi engellenmiş olur (126). Son yıllarda, böbrekte sfingolipid birikimi ile glomerüler hastalıklar arasında ilişki olduğu anlaşılmıştır (127, 128).



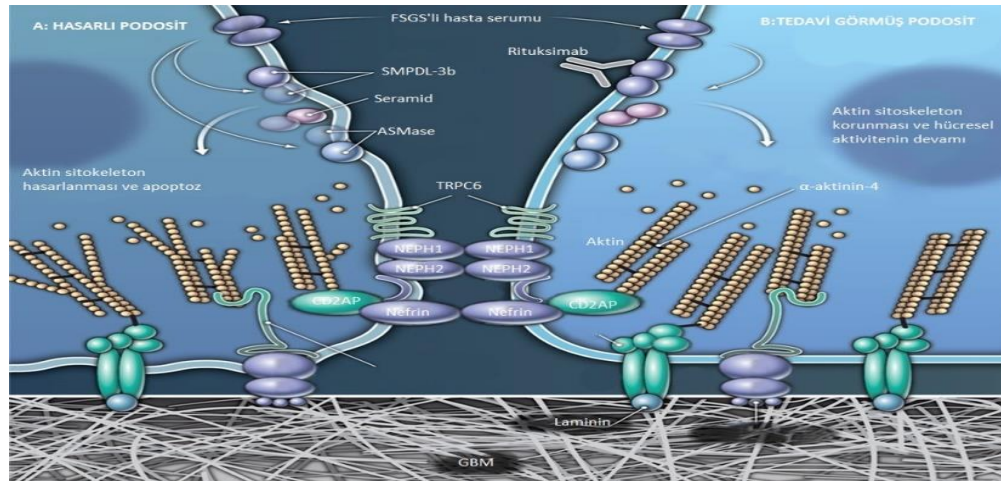
Şekil 11: Seramidin farklı yollarla sentezi ve ASMase aktivitesi (59)

Merscher vd. FSGS'li hastaların podositlerinde ASMase aktivitesinin ve ASMase ile aynı homolojiye sahip bir protein olan SMPDL-3b ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir (59). SMPDL-3b, podositlerin lipid yapılarında bulunur ve ASMase'a benzer şekilde sfingomiyelinin seramide dönüştürülmesinde rol oynar (59) (Şekil 12). SMPDL-3b eksikliği sfingomiyelin birikimine yol açarak aktin remodelingini olumsuz etkileyip podositleri apoptozise duyarlı hale getirir (129).



Şekil 12: Sfingomiyelin seramid dönüşümü

Son yıllarda yapılan çalışmalar CD20 monoklonal antikor olan rituksimabın B hücre depleksiyonundan bağımsız SMPDL-3b ekspresyonunda down regülasyonu engelleyerek ya da SMPDL-3b'ye bağlanarak proteinürüri engellediğini göstermiştir (8, 130-132) (Şekil 13).



Şekil 13: Rituksimab SMPDL-3b ilişkisi: Podosit hücreleri FSGS hasta serumuyla temas ettiğinde SMPDL-3b down regülasyonu seramid sentezinde azalmaya sebep olarak ya da indirekt yoldan ASMase aktivitesini azaltmasına sebep olarak seramid sentezini azaltır. Böylece aktin hücre sitoskeletonu bozulur ve hücre apoptozis ederler (A: Hasarlı podosit). Rituksimab SMPDL-3b down regülasyonunu önleyerek hücre devamlılığı sağlar (B: Tedavi görmüş podosit) (133).

Son 10 yıl içinde gerek deneysel gerek hücre kültürü çalışmalarında SMPDL-3b ile NS ve rituksimab ilişkili çalışmalar artmıştır. Ancak NS'li insan biyopsilerinde SMPDL-3b mRNA ekspresyonunun Real time PCR ile bakıldığı bir çalışma literatürde mevcut değildir. Buradan yola çıkarak yaptığımız çalışmanın amaçları; 1-Nefrotik sendromlu hastalarda böbrek biyopsi örneklerinde SMPDL-3b boyanmasını immun histokimyasal yöntemlerde göstermek, Real time PCR yöntemiyle SMPDL-3b ekspresyonundaki seviyeleri saptamak ve SMPDL-3b düzeylerinin nefrotik sendrom alt grupları arasında farklı olup olmadığını göstermek, 2-Nefrotik sendromlu çocukların

tedavilerinde kullanılan başta rituksimab olmak üzere steroid, KNI, MMF gibi immunsupresif tedavilerin yanıtında, böbrek biyopsilerinde SMPDL-3b boyanması ve ekspresyonunun tedavide yol gösterip göstermediğine yanıt bulmaktır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 2011-2021 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji Bilim Dalı'nda takip edilen NS hastaları retrospektif olarak değerlendirildi. Sekonder NS olan hastalar ve takibinde biyopsi yapılmayan hastalar çalışmaya alınmadı. İNS tanısı almış ve takibinde klinik gerekçeleri nedeniyle biyopsi yapılmış 48 hasta incelendi. Moleküler patoloji çalışmaları esnasında 7 hasta, immunohistokimya çalışmaları esnasında 11 hasta teknik aşamada biyopsi dokusundaki yetersizlik nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Teknik nedenlerle 4 hasta iki çalışmaya da alınamazken geri kalan 44 hastadan moleküler değerlendirmeye 41 hasta, immunhistokimyasal değerlendirmeye 37 hasta dahil edildi.

Hastalara ait tanı yaşı, cinsiyet, klinik tanılar, hipertansiyon, histopatolojik bulguları, laboratuvar bulguları, steroid yanıtı, siklofosamid yanıtı, MMF yanıtı, KNI yanıtı, rituksimab yanıtı, remisyon durumu, genetik mutasyon varlığı gibi demografik veriler çocuk nefroloji BD dosya arşivinden ve hastane bilgi sisteminden tarandı. Hastaların glomeruler filtrasyon hızları (GFR) shwartz formülü (kas faktörü x boy / serum kreatinin) ya da konvansiyonel kreatin klirensi (( İdrar Volümü x İdrar Kreatinin x 1.73 ) / (Serum Kreatinin x 1440 x Vücut Yüzey Alanı)) kullanılarak hesaplandı (134). Tüm biyopsi materyalleri hastaların ilk başvurduğu ve glomerüler filtrasyon hızları normal iken yapılmış böbrek biyopsileri idi.

Hastalar steroid yanıtlarına göre SSNS ve SRNS olmak üzere gruplara ayrıldı. SSNS'li hastalar ise; seyrek relaps NS ile sık relaps ve steroid bağımlı NS olmak üzere kendi aralarında gruplandırıldılar. Hastalar diğer immünsüpresif ilaç yanıtlarına göre de duyarlı ve dirençli olmak üzere gruplara ayrıldılar. Seçilmiş olan hastaların formalin ile tespit edilmiş parafine gömülü böbrek biyopsi doku örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD arşivinden çıkarıldı. Tüm hastaların böbrek dokularından yeniden hazırlanan kesitlere immunhistokimyasal yöntemlerle anti-SMPDL3B poliklonal antikor uygulandı. Ayrıca tüm hastaların parafine gömülü biyopsi doku örneklerinden SMPDL-3b mRNA eldeleri moleküler patoloji laboratuvarında Real-Time PCR yöntemi ile ölçüldü. Böbrek biyopsi örneklerinin immunhistokimyasal anti-SMPDL3B boyanması ve Real time PCR ile SMPDL-3b ekspresyonları immünsüpresif ilaç yanıtlarına göre, patoloji sonuçlarına ve progresyonlarına göre karşılaştırıldılar.

## Moleküler patoloji

Real time PCR değerlendirmesi için seçilen dokuların parafin blok örneklerinden 10µM kesit alınarak 1,5 veya 2ml ependorf tüplere aktararak örnekler toplandı ve RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi. Elde edilen mRNA'ların degrade olmasını engellemek için, örnekler -80 derecede saklandı. cDNA (tamamlayıcı DNA) sentezi için "Evoscript Universal cDNA Synthesis" kiti kullanıldı. Tüpler buza yerleştirildi ve 5 dk boyunca RNA'lar inkübe edildi. Tüpler thermal cycler'a yerleştirildi ve cDNA elde edildi. Primer prob sulandırma işlemi için primerler sulandırılarak 30 sn. vorteks ve 30 sn. spin edildi. Real time primer miksi hazırlanırken her gen için ayrı bir ependorf tüp hazırlandı ve isimlendirildi. Real-time PCR ile her bir gen için ayrı ayrı real time miksi hazırlandı. Real time miksi Lightcycler 480 Probes Master 500 reaksiyonluk ile hazırlandı. 2,5 ul cDNA örneği veya kontrol her bir kuyucuğa son reaksiyon hacmi 20 ul olacak şekilde ilave edildi. Elde edilen cDNA'lar, Cobas z480 de UDF software ile real time PCR yöntemi ile çalışıldı. Örnek isimleri ve gen isimleri cihaz software'ine girildikten sonra referans gen ACTB (Beta aktin) seçilerek relatif kantitasyon yapılabilmek için  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu kullanıldı.

### $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi

Real time PCR, DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyal miktarının ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Amplifikasyon döngüsünde genler ikiye katlanarak logaritmik şekilde çoğalır. CT (cycle threshold) floresan sinyal miktarının gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısına (eşik döngüsü) verilen addır. Gen miktarı ne kadar fazlaysa o kadar az katlanmayla saptanabilir bundan dolayı CT değeri " $2^{-n}$ " olarak tanımlanır.

Rölatif kantitasyon bir örnekteki ilgili genin ekspresyonunun referans gen ekspresyonu ile karşılaştırıldığı yöntemdir. Bu yöntemle gen ekspresyonundaki fizyolojik değişiklikler göz ardı edilmemiş olur. Referans gen için pratikte daha çok ACTB referans geni kullanılır. Hedef gen CT değeri, referans gen CT değerinde çıkarılarak normalize edilmiş olur. Hesaplanan sayı (ratio değeri)  $2^{-\Delta CT}$  ile ifade edilir.



Karşılaştırılacak grupların normalize değerlerinin ortalamaları hesaplanır. İki grubun ortalamaları birbirine bölünerek fold change (kat değişimi) bulunur. Bu işleme  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi denir. Fold change (FC) <1 olanlar azalmış ekspresyon (down regülasyon) olarak kabul edilirken, FC>1 olanlar artmış ekspresyon (up regülasyon) olarak kabul edilir. Analiz için pratikte daha çok 1.5 kat veya 2 kat değişiklik anlamlı olarak değerlendirilir (135, 136). Bizim çalışmamızda 1.5 kat ve üzerinde değişiklik gösteren genler anlamlı olarak kabul edildi.

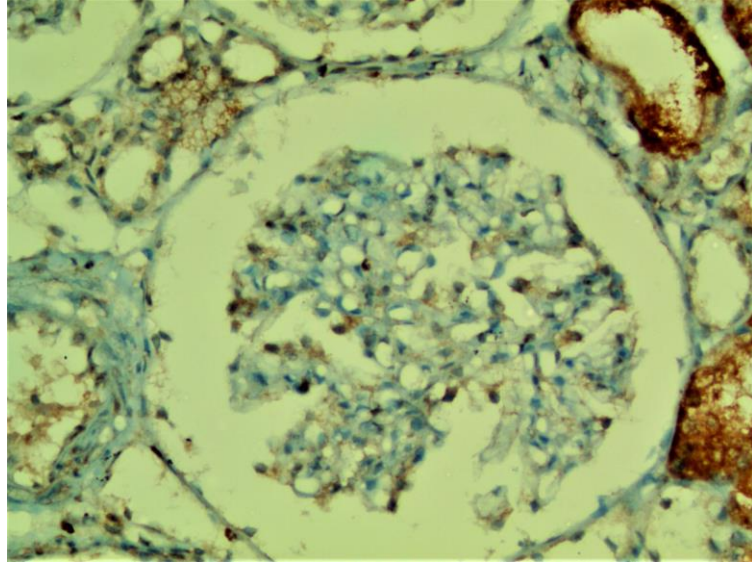
### İmmünohistokimya

İmmünohistokimyasal boyama için seçilen dokulardan elektrostatik yüklü lamlara 2 µm kalınlığında kesitler alındı ve etüvde 60 °C’de en az iki saat kurutuldu. Tüm hastalara anti-SMPDL3B ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. 37 °C’de 1:150 dilüsyonda 100 dakika inkübe edildi. Anti-SMPDL3B için ThermoFisher firmasının poliklonal antikorunu kullanıldı (SMPDL-3B Polyclonal Antibody). Pozitif kontrol olarak ince bağırsak dokusu kullanıldı. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere, tüm boyama süreci Ventana, Benchmark LT tam otomatik immünohistokimya boyama cihazında gerçekleştirildi. Zıt boyama, hematoksilen ve mavileştirici solüsyon ile cihazda tamamlandı. Kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılmaları ve lamel ile kapatılma aşamaları elde yapılarak immünohistokimya boyama protokolü tamamlandı.

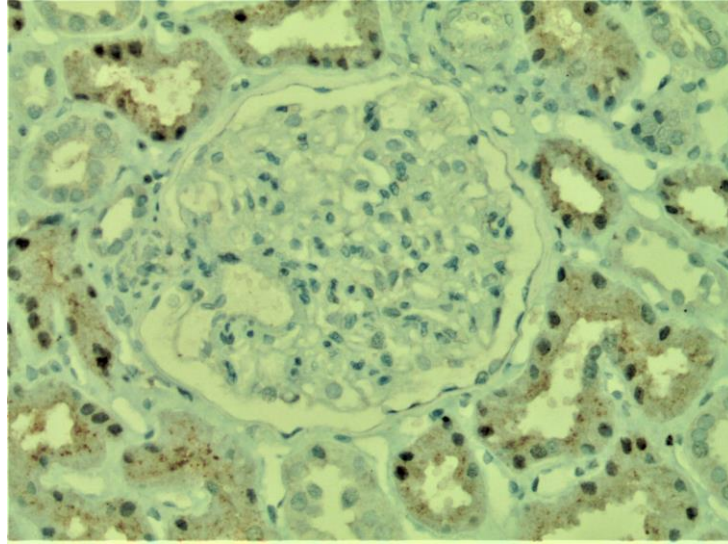
İmmünohistokimyasal boyama özellikleri ışık mikroskopunda incelendi. Verilerin nicelleştirilmesi için görsel derecelendirme sistemi kullanıldı (Tablo 5). Klinik özelliklerine göre ayrılan gruplar arasında tanımlanan demografik özellikler ve anti-SMPDL3B boyanımı karşılaştırıldı.

Tablo 5: Verilerin nicelleştirilmesi için görsel derecelendirme sistemi	
0	Boyanma yok
1+	Boyanma var

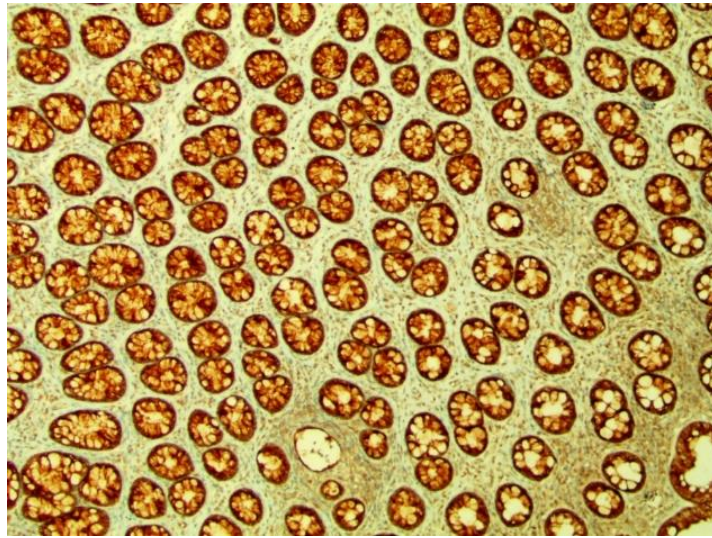
Anti SMPDL-3b ile immünohistokimyasal boyanma 25 (% 67,6) hastada “0”, 12 (% 32,4) hastada “1+”, olarak değerlendirildi. Dokuların anti SMPDL-3b ile immünohistokimyasal boyanma özellikleri görsel derecelendirme sistemine uygun olarak şekil 14 ve şekil 15’te verilmiştir. Pozitif kontrol olarak seçtiğimiz ince bağırsak dokusundaki immünohistokimyasal boyanma ise şekil 16’da gösterilmiştir.



Şekil 14: Anti-SMPDL3B pozitif glomerul (İHK ;400X)



Şekil 15: Anti-SMPDL3B negatif glomerul (İHK ;400X)



Şekil 16: Anti-SMPDL3B pozitif ince bağırsak dokusu (İHK ;100X)

## **İstatistiksel analiz**

Analizler ve grafikler için Graphpad Prism 8.0.2 ile SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.) paket programı kullanıldı. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma, ortanca (interquartile range=IQR =çeyrekler arası aralık) ve kategorik değişkenler frekans (yüzde) olarak ifade edilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki farklılıkların incelenmesinde Ki kare analizi kullanılmıştır. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Real time PCR değerlendirme  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi ile yapılmıştır.  $FC > 1,5$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## **Etik kurul**

“Nefrotik sendromlu çocukların böbrek biyopsi örneklerinde sfingomiyelin fosfodiesteraz acid like 3b (SMPDL-3b) boyanması immün sistem cevabında yol gösterici olabilir mi ?” adlı tez çalışmamız için Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma Etik Kurulu tarafından 16/01/2020 tarih ve 1 sayılı kurul toplantısında kurul kararı ile etik kurul onayı alındı.

#### 4. BULGULAR

Hastaların yaş ortalaması  $7,54 \pm 5,57$  (0,5-18) yıl olup 18 kız ve 26 erkekten oluşmaktaydı. Hastaların 6 tanesinde hipertansiyon mevcuttu (Tablo 6). Hastaların tanı aldığı dönemdeki laboratuvar değerlerinde serum albumin ortalaması  $2,03 \pm 0,70$  gr/dl, 24 saatlik idrarda proteinüri ortalama  $175,08 \pm 157,99$  mg/m<sup>2</sup>/saat (40,00 - 635,00) saptandı. Hematüri 7 hastada vardı (Tablo 7).

Tablo 6: Demografik bulgular

<b>TANI YAŞI (yıl)</b>	
Aritmetik ortalama (AO) ± Standart sapma (SS)	7,5 ± 5,5
Median	5 (0,50 - 18,00)
<b>CİNSİYET Erkek/Kız</b>	26/18
<b>HT var/yok</b>	6/38
<b>HEMATÜRİ var/yok</b>	7/37
<b>GENETİK MUTASYON var/yok</b>	8/10

Tablo 7: Laboratuvar bulgular

	<b>ALBUMİN</b>	<b>24 SAATLİK İDRAR (mg/g)</b>	<b>24 SAATLİK İDRAR (mg/m<sup>2</sup>/sa)</b>
<b>AO ± SS</b>	2,0377 ± 0,70831	3786,7561 ± 4458,66099	175,0829±157,99503
<b>Median</b>	1,95 (1,10 - 4,60 )	2461 (773 - 19362)	111 (40 - 635)

Histopatolojik olarak sınıflandırıldığında 44 hastanın 20'si FSGS ile uyumlu iken 19 hastada spesifik bulgu yoktu. Geri kalan 5 hastanın biyopsi materyalleri ise membranoproliferatif glomerülonefrit, diffüz mezengial skleroz ve membranöz glomerülonefrit uyumlu idi (Tablo 8).

Tablo 8: Hastaların Biyopsi Özellikleri

Normal	20 (%45,5)
FSGS	19 (43,2)
Diğer (MGN,MPGN)	5 (%11,4)

#### Steroid yanıtına göre hasta grupları

Hastaların 19'u SSNS olup 25 tanesi SRNS tanısı aldı. SSNS'lerin 6 tanesi tek atak geçirmiş (relaps gelişmemiş), 1 hasta seyrek relaps,12 hasta ise sık relaps ya da steroid bağımlı NS tanısı almıştı (Tablo 9 ). SRNS'li hastaların biyopsi materyallerinde 14'ü FSGS ile uyumlu iken, 6'sında normal biyopsi bulguları, 5 tanesinde membranoproliferatif glomerülonefrit, diffüz mezengial skleroz ve membranöz glomerülonefrit uyumlu bulgular mevcuttu.

<i>Tablo 9: Hastaların steroid yanıtına göre gruplandırılması</i>	
SRNS	25 (%56,8)
SSNS	19 (%43,2)
Tek atak	6 (%31,6)
Seyrek relaps	1 (%5,3)
Sık relaps +SBNS	12 (%63,2)

### **KNİ yanıtına göre hasta grupları**

SRNS'li 25 hastanın tümüne ve SBNS tanılı hastaların 7'sine tedavide KNİ verildi. KNİ tedavisi verilen hastalardan 22'sinde tedaviden sonra proteinüride gerileme saptandı. 10 hastada ise tedavi sonrası proteinüride gerileme olmadı. KNİ ilaçlar olan takrolimus ve siklosporin ayrı gruplar olarak değerlendirildiğinde ise siklosporin alan 32 hastanın 17'sinde tam remisyon 4'ünde kısmi remisyon sağlandığı 11 hastanın ise tedaviye yanıtı olmadığı görüldü. Diğer KNİ takrolimusun verildiği 5 hastanın ise 3'ünde tedaviye yanıt alınırken 2 hasta tedaviye dirençliydi (Tablo 10).

<i>Tablo 10: Hastaların KNİ yanıtına göre gruplandırılması</i>	
<b>KNİ YANITI</b>	
Yanıtlı	22 (%68,7)
Yanıtızsız	10 (%31,3)
<b>SİKLOSPORİN YANITI</b>	
Yanıtlı	21 (%65,6)
Kısmi remisyon	4 (%12,5)
Tam remisyon	17 (%53,1)
Yanıtızsız	11 (%34,4)
<b>TAKROLİMUS YANITI</b>	
Yanıtlı	3 (%60)
Yanıtızsız	2 (%40)

### **MMF yanıtına göre hasta grupları**

SRNS ve SBNS tanılı hastalardan 10'una MMF tedavisi uygulanmış ve hastaların yarısı tedaviyle remisyona girerken geri kalan yarısı ise tedaviye yanıt vermemişti (Tablo 11).

<i>Tablo 11: Hastaların MMF yanıtına göre gruplandırılması</i>	
Yanıtlı	5 (%50)
Dirençli	5 (%50)

### **Siklofosfamid yanıtına göre hasta grupları**

SBNS tanılı hastalardan siklofosfamid uygulanan 9 hastanın 7 tanesinde yanıt alınırken geriye kalan 2 hastada ise tedavi sonrası proteinüride gerileme olmadı. (Tablo 12)

<i>Tablo 12: Hastaların siklofosfamid yanıtına göre gruplandırılması</i>	
Yanıtlı	7 (%77,8)
Dirençli	2 (%22,2)

### Rituksimab yanıtına göre hasta grupları

Rituksimab tedavisi uygulanan 13 hastadan 6'sında tam remisyona ulaşılırken bir hasta kısmi remisyonda, 6 hasta ise tedaviye yanıtızsıdır. Rituksimab alan 13 hastanın 4'ü sık relaps veya SBNS idi ve bu 4 hastanın hepsi rituksimaba yanıtlydı. Kalan 9 hasta SRNS idi ve bu hastaların 3'ü rituksimab yanıtly, 6'sı yanıtızsıdır. (Tablo 13)

Yanıtly	7 (%53,8)
Yanıtızsı	6 (%46,2)

### Hastaların progresyon durumları

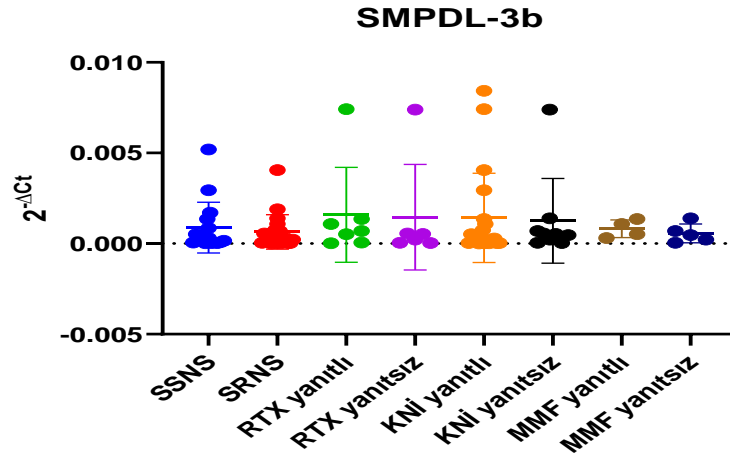
Hastaların 28'i tam remisyona girerken 13 hastada ise hiçbir immünsüpresif ilaca yanıt alınamamış ve kronik böbrek hastalığı (KBH) gelişmişti. Üç hastanın ise immünsüpresif tedavisi devam etmekteydi (Tablo 14). SRNS'li hastaların 13'ünde (%52) KBH gelişirken 9'unun (%36) GFR'si normal ve proteinürisi yoktu. Üç hastanın (%12) ise immünsüpresif tedavileri devam etmekte ve GFR'leri normaldi. KBH gelişen hastaların hepsi SRNS idi. Bu 13 hastanın 4'ünde genetik mutasyon yokken 5'inde mutasyon saptanmıştır. Bu hastalarda böbrek fonksiyonlarında bozulmanın başlama süresi ortalama  $28,76 \pm 15,05$  ay idi. SRNS'lerde böbrek fonksiyonlarında bozulmanın başlama zamanı genetik mutasyon saptananlarda  $23,60 \pm 2,15$  ay iken, genetik mutasyon saptanmayanlarda  $41,50 \pm 11,57$  ay idi.

Tam remisyonda	28 (%63,6)
KBH	13 (%29,5)
Tedavisi devam edenler	3 (%6,8)

#### 4.1. Dokuların SMPDL-3b ekspresyonunun Real time PCR ile değerlendirilmesi

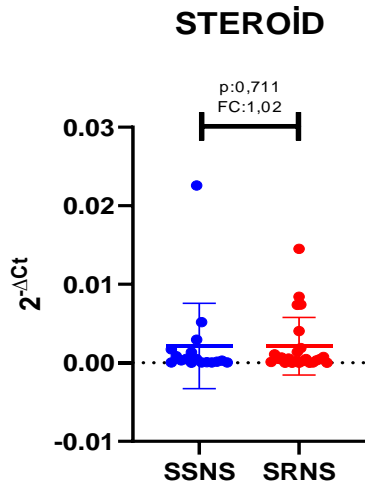
Moleküler patoloji laboratuvarında çalışmaya alınan 44 hastadan 3 hasta teknik nedenlerle çalışmadan çıkarıldı. Diğer 41 hastanın SMPDL-3b ekspresyonu Real time PCR yöntemi ile değerlendirildi.

Hastalar immünsüpresif ilaç yanıtına göre gruplandırılıp SMPDL-3b ekspresyonları karşılaştırıldı. (Şekil 17)



Şekil 17: İmmünsüresif yanıtlarına göre SMPDL-3b ekspresyonu

SSNS hasta grubunda SMPDL-3b ekspresyonu  $0,00215 \pm 0,00543$  ( $0,0000154 - 0,0226$ ), SRNS grubunda ise  $0,00211 \pm 0,00366$  ( $0,00153 - 0,0145$ ) saptandı. SSNS grubunda SMPDL-3b ekspresyonu 1,021 kat daha yüksekti ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p değeri: 0,711, FC<1,5) (Tablo 15, Şekil 18).

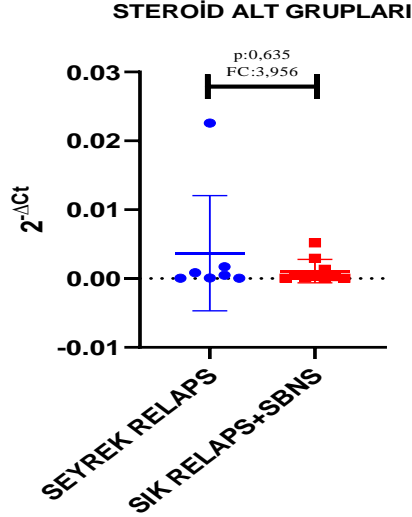


Steroid yanıtı	SSNS	SRNS	
AO ± SS	$0,00215 \pm 0,00543$	$0,00211 \pm 0,00366$	
MED	0,000306	0,000508	p: 0,711
IQR (25-75%)	$0,0000555 \pm 0,00153$	$0,0000622 - 0,00176$	
MİN-MAX	$0,0000154 - 0,0226$	$0,00153 - 0,0145$	

FC:1,02

Şekil 18: Steroid yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu

Steroid yanıtli hastalar kendi içerisinde relaps sayısı ve bağımlılık durumuna göre gruplandırılıp karşılaştırıldı. Seyrek relaps NS grubunda SMPDL-3b ekspresyonu  $0,00429 \pm 0,00898$  ( $0,0000351 - 0,0226$ ), sık relaps-steroid bağımlı NS grubunda  $0,00108 \pm 0,00170$  saptandı.  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metoduyla yapılan değerlendirmede seyrek relaps grubunda SMPDL-3b ekspresyonu 3,97 kat fazlaydı ve anlamlıydı (FC>1,5) ancak p değeri istatistiksel olarak anlamsızdı (p: 0,635) (Tablo 16, Şekil 19).

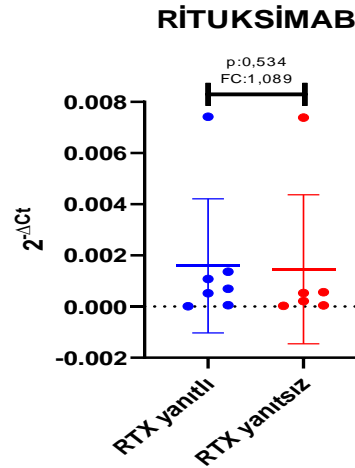


*Tablo 16: Relaps durumuna göre SMPDL-3b ekspresyonu*

	Seyrek relaps NS (n=7)	Sık relaps NS+SBNS (n=10)	
AO ± SS	0,00429 ± 0,00898	0,00108 ± 0,00170	
MED	0,000667	0,000294	p: 0,635
IQR (25-75%)	0,0000708 - 0,00693	0,0000470 ± 0,00175	
MİN-MAX	0,0000351 - 0,0226	0,0000154 - 0,00519	
			<b>FC:3,956</b>

Şekil 19: Relaps durumuna göre SMPDL-3b ekspresyonu

Ritüksimab yanıtı grupta SMPDL-3b ekspresyonu  $0,00159 \pm 0,00261$  (0,0000154 - 0,00742), ritüksimab dirençli grupta  $0,00146 \pm 0,00291$  (0,0000297 - 0,00739) saptandı. Ritüksimab yanıtı grubun SMPDL-3b ekspresyonu yanıtızsız gruba göre 1,089 kat fazlaydı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p: 0,534, FC<1,5) (Tablo 17, Şekil 20).



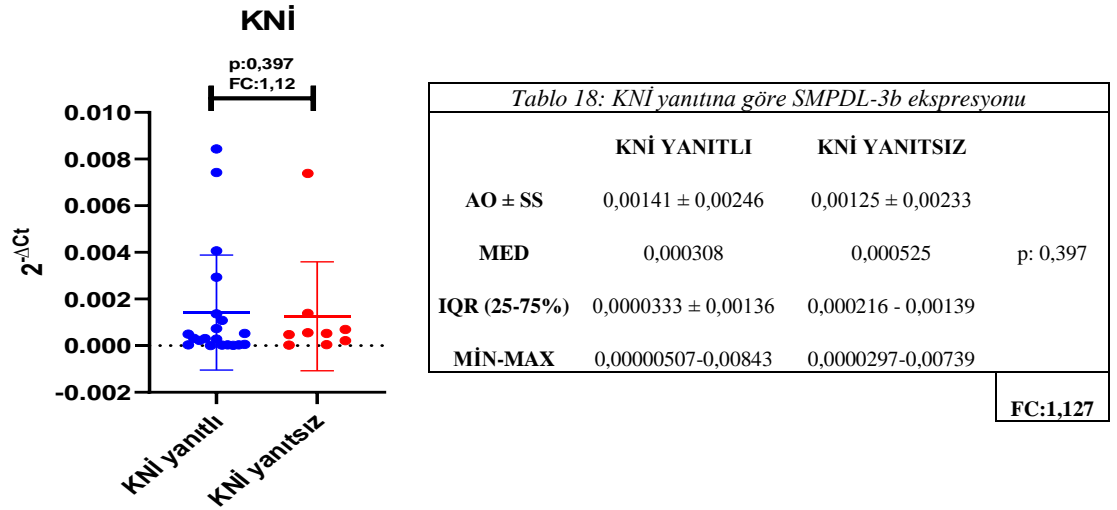
*Tablo 17: Ritüksimab yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu*

	RİTÜKSİMAB YANITLI	RİTÜKSİMAB YANITSIZ	
AO ± SS	0,00159 ± 0,00261	0,00146 ± 0,00291	
MED	0,000693	0,00037	p: 0,534
IQR (25-75%)	0,0000504 ± 0,00136	0,0000401 - 0,00226	
MİN-MAX	0,0000154-0,00742	0,0000297-0,00739	
			<b>FC:1,089</b>

Şekil 20: Ritüksimab yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu

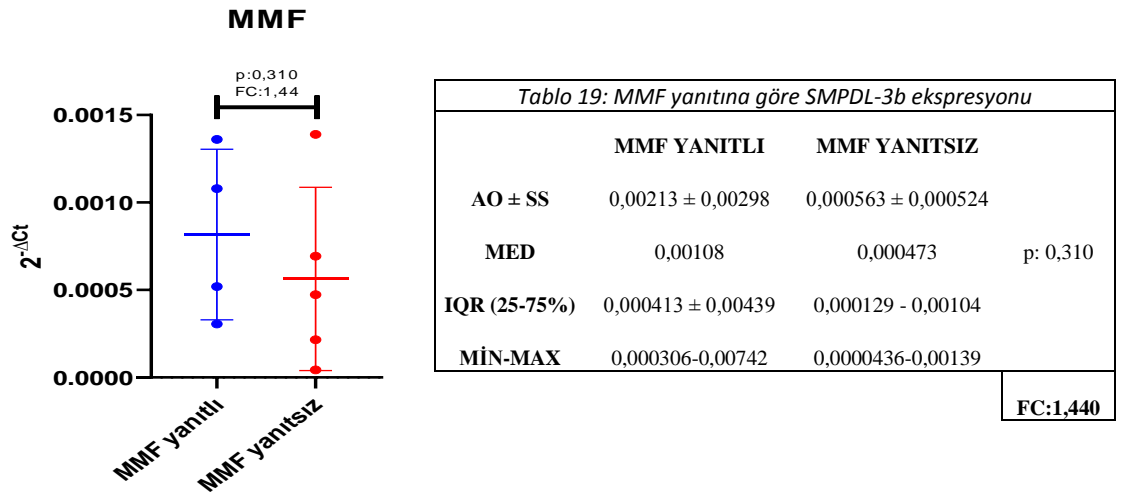
KNİ yanıtli grupta SMPDL-3b ekspresyonu  $0,00141 \pm 0,00246$  (0,00000507 - 0,00843), KNİ dirençli grupta  $0,00125 \pm 0,00233$  (0,0000297 - 0,00739) saptandı. KNİ yanıtli grupta SMPDL-3b ekspresyonu KNİ yanıtızsız gruba karşılaştırıldığında 1,127 kat fazlaydı ancak istatistiksel olarak anlamsızdı (p:0,397) (Tablo 18, Şekil 21).





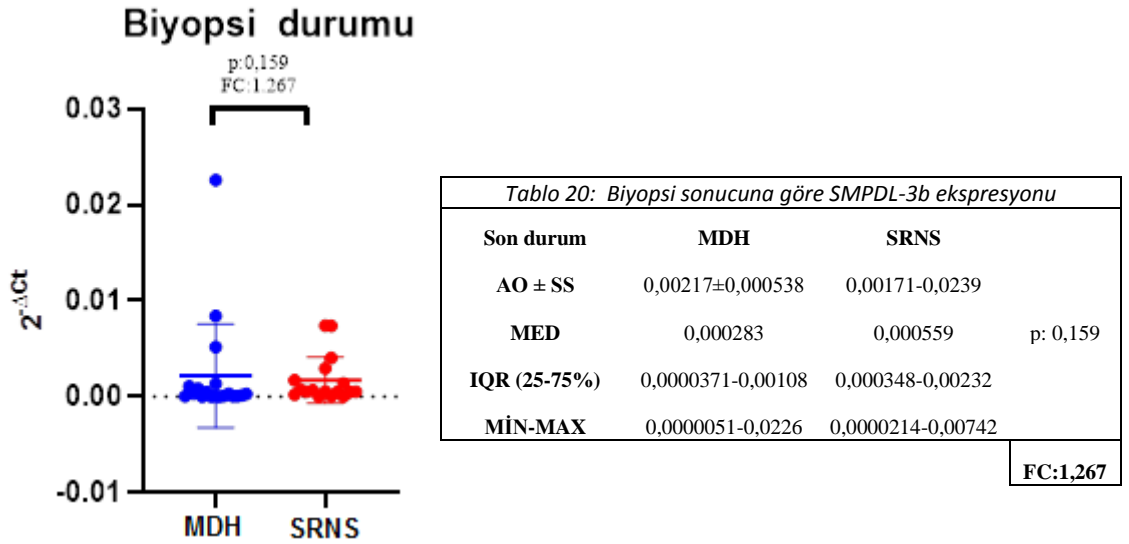
Şekil 21: KNİ yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu

MMF yanıtı grupta SMPDL-3b ekspresyonu  $0,00213 \pm 0,00298$  ( $0,000306 - 0,00742$ ), MMF dirençli grupta  $0,000563 \pm 0,000524$  ( $0,0000436 - 0,00139$ ) saptandı. MMF yanıtı grupta SMPDL-3b ekspresyonu MMF dirençli hasta grubuna göre 1,44 kat fazlaydı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p değeri: 0,310,  $FC < 1,5$ ) (Tablo 19, Şekil 22).



Şekil 22: MMF yanıtına göre SMPDL-3b ekspresyonu

Biyopsi sonuçlarına göre SMPDL-3b ekspresyonu MDH'li hastalarda  $0,00217 \pm 0,000538$  ( $0,0000051 - 0,0226$ ) FSGS'li hasta grubunda  $0,00171 - 0,0239$  ( $0,0000214 - 0,00742$ ) saptandı. SRNS'li hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu KBH'li hastalara göre 1,267 kat fazlaydı ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p değeri: 0,846) (Tablo 20, Şekil 23).



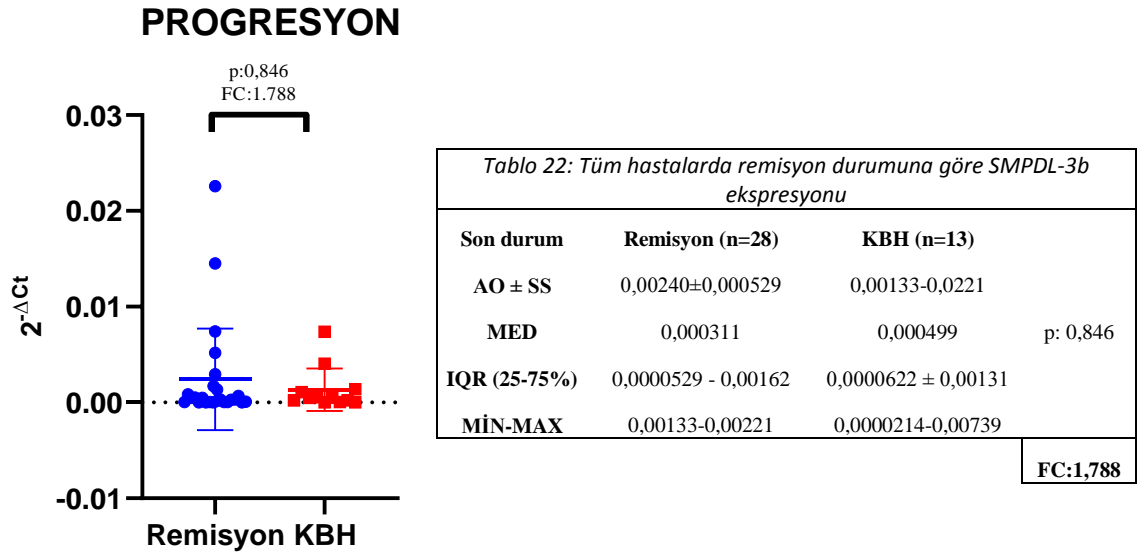
Şekil 23: Biyopsi sonucuna göre SMPDL-3b ekspresyonu

Genetik mutasyon bulunmayan hasta grubunda SMPDL-3b ekspresyonu  $0,000297 \pm 0,000220$  ( $0,0000504-0,000693$ ), mutasyonlu grupta  $0,0000436-0,00742$  ( $0,0000436-0,00742$ ) saptandı. Mutasyonsuz grupta SMPDL-3b ekspresyonu  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemine göre 1,344 kat fazlaydı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p değeri: 0,13,  $FC < 1,5$ ) (Tablo 21).

Mutasyon	Yok (n=10)	VAR (n=8)	
AO ± SS	$0,000297 \pm 0,000220$	$0,0000436-0,00742$	
MED	0,000224	0,00139	p: 0,130
IQR (25-75%)	$0,0000555 - 0,000122$	$0,000163 \pm 0,00601$	
MİN-MAX	$0,0000504-0,000693$	$0,0000436-0,00742$	

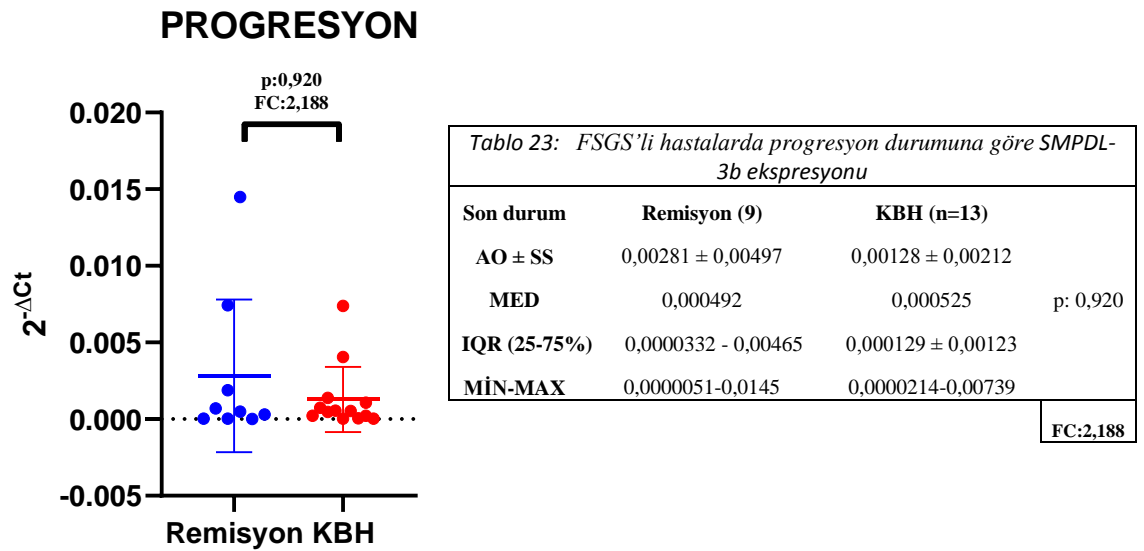
**FC:1,344**

Tüm hastalar progresyon durumlarına göre karşılaştırıldığında SMPDL-3b ekspresyonu remisyonda olan hasta grubunda  $0,00240 \pm 0,00133$  ( $0,00133-0,00221$ ) KBH hasta grubunda  $0,00133 \pm 0,00221$  ( $0,0000214-0,00739$ ) saptandı. Remisyondaki hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu KBH'li hastalara göre 1,788 kat fazlaydı ve anlamlıydı ( $FC > 1,5$ ) ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p değeri: 0,846) (Tablo 22, Şekil 24).



Şekil 24: Tüm hastalarda remisyon durumuna göre SMPDL-3b ekspresyonu

SRNS'li hastalar remisyon durumuna göre karşılaştırıldığında remisyona giren hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu  $0,00281 \pm 0,00497$  (0,0000051-0,0145) KBH'li hastalarda  $0,00128 \pm 0,00212$  (0,0000214-0,00739) saptandı. Remisyondaki hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu KBH'li hastalara göre 2,18 kat fazla ve anlamlıydı ( $FC > 1,5$ ) ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p değeri: 0,920) (Tablo 23, Şekil 25).



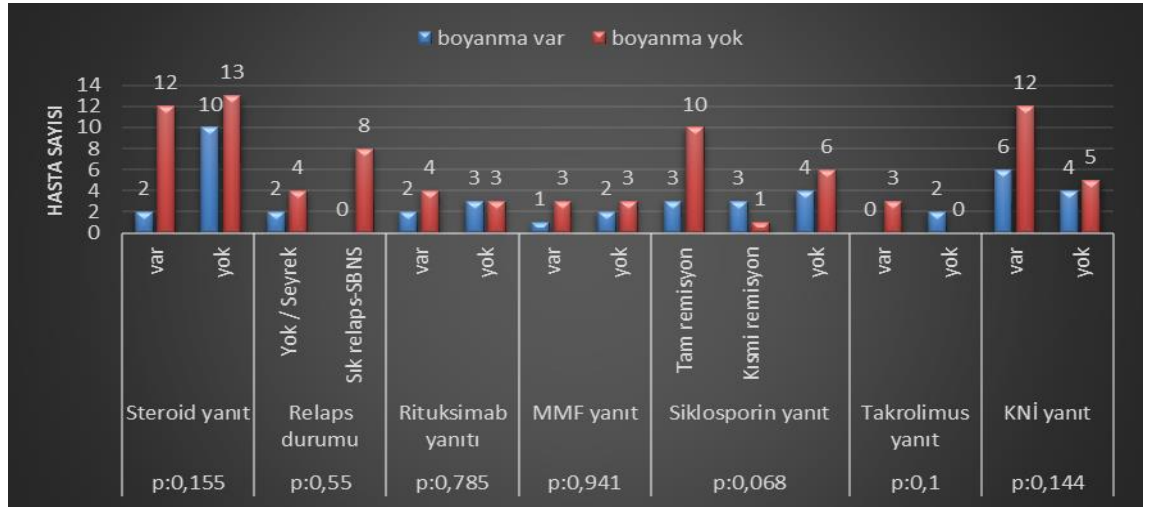
Şekil 25: FSGS'li hastalarda progresyon durumuna göre SMPDL-3b ekspresyonu

#### 4.2. Dokuların SMPDL-3b boyanmalarının immunhistokimyasal karşılaştırılması

Anti-SMPDL3B ile immunhistokimyasal inceleme için 44 hasta çalışmaya alındı. Yedi hasta doku yetersizliği ve teknik nedenler nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Geri kalan 37 hasta tedavi yanıtına göre gruplandırılıp değerlendirildi (Tablo 24).

Steroid yanıtına göre hastalar gruplandırılıp karşılaştırıldığında SSNS'li 14 hastanın 2'sinde boyanma vardı (%14). SRNS'li 23 hastanın ise 10'unda boyanma vardı (%43). İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p:0,155). SSNS hastaları relaps durumuna göre değerlendirildiğinde seyrek relaps NS hasta grubunda 4 hastanın 2'sinde boyanma oldu (%50). Sık relaps ve steroid bağımlı NS grubunda 8 hastanın hiçbirinde boyanma olmadı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p:0,55) (Tablo 24).

Hastalar rituksimab yanıtına göre gruplandırıldığında rituksimaba yanıt veren 6 hastanın 2'sinde boyanma vardı (%33). Rituksimab yanıt vermeyen 6 hastanın yarısında boyanma vardı (%50). İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p:0,785) (Tablo 24).



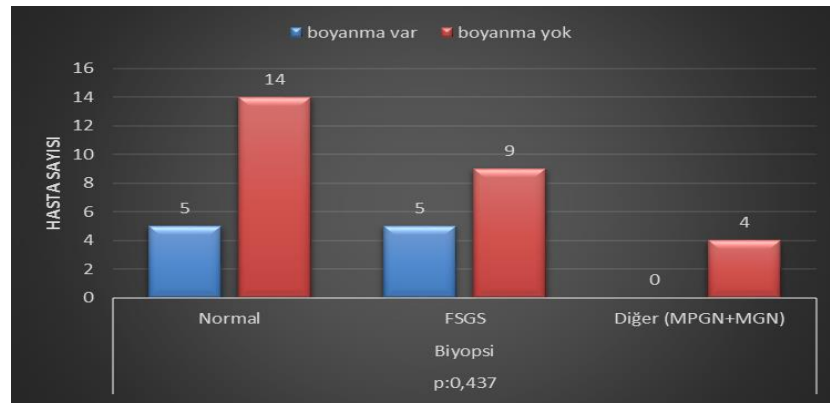
Tablo 24: İmmünsüresif yanıtına göre SMPDL-3b boyanması

MMF tedavisine yanıt veren ve immunhistokimyasal boyanması yapılan 4 hastanın birinde boyanma vardı (%25). MMF yanıt vermeyen 5 hastanın 2 tanesinde boyanma vardı (%40). İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p:0,941) (Tablo 24).

KNİ yanıt veren 18 hastanın 6'sında boyanma görüldü (%33). KNİ yanıtı olmayan 9 hastanın ise 4'ünde boyanma vardı (%44). İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p:0,144). KNİ olan siklosporin ve takrolimus tedavileri kendi içerisinde tedavi yanıtına göre ayrı olarak değerlendirildiğinde ise siklosporinle tam remisyon

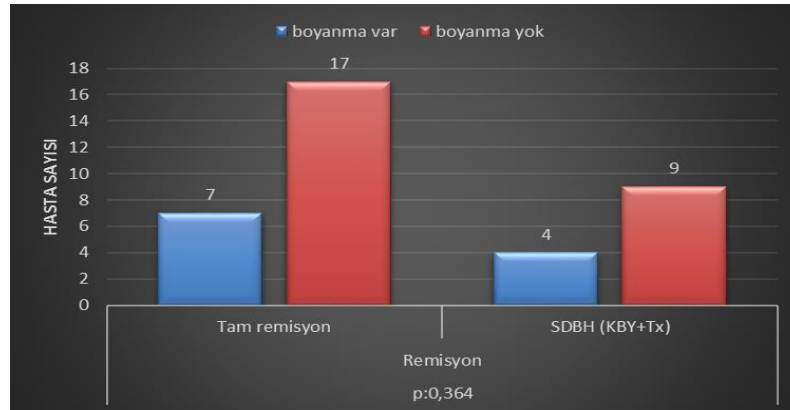
sağlanan 13 hastadan 3 tanesinde boyanma vardı (%23). Kısmi remisyona giren 4 hastanın birinde boyanma görüldü (%25). Siklosporine yanıt vermeyen 10 hastanın 4'ünde boyanma vardı (%40). Siklosporin tedavisine yanıt verenlerle vermeyenler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p:0,068). Takrolimusa yanıt veren 3 hastanın hiçbirinde boyanma olmazken, yanıt vermeyen 2 hastanın ikisinde de boyanma vardı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p:0,1) (Tablo 24).

Hastalar biyopsi tanılarına göre gruplandırıldığında, biyopsisi normal 19 hastanın 5'inde (%26) anti-SMPDL3B boyanması saptandı. FSGS'li 14 hastanın 5'inde boyanma saptandı (%35). MPGN, MGN, DMS biyopsi tanı 4 hastanın hiçbirinde boyanma olmadı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (P:0,437) (Tablo 25).



Tablo 25: Biyopsi sonucuna göre SMPDL-3b boyanması

Hastaların remisyon durumuyla boyanma oranları karşılaştırıldığında, tam remisyonda 24 hastanın 7'sinde (%29), KBH olan 13 hastanın 4'ünde (%30) immunhistokimyasal anti-SMPDL3B boyanması pozitif saptandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p:0,068) (Tablo 26).



Tablo 26: Remisyon durumuna göre SMPDL-3b boyanması

## 4 TARTIŞMA

İNS çocuklarda en sık görülen böbrek hastalıklarındandır (1). Bu hastaların %80'ini steroide yanıt veren MDH oluşturur (2). SSNS en sık 1-4 yaş arasında görülür ancak yaşla beraber SRNS sıklığı artar. Ayrıca İNS erkeklerde daha sık görülmektedir (erkek/kız oranı: 2/1) (15, 22, 23). Bizim çalışmamızda hastaların yaş ortalaması  $7,54 \pm 5,57$  (0,5-18) yıl olup literatüre benzer şekilde erkek/kız oranı 1,5 idi. Çalışmamızda hastalar daha çok steroide yanıt vermeyen böbrek biyopsisi yapılan SRNS grubu hastalar olduğu için yaş ortalaması yüksekti. Yapılan çalışmalarda, NS'li çocuklarda hipertansiyon prevalansının %8 ila %59,1 arasında değiştiği gösterilmiştir (137). Bizim çalışmamızda hastaların %13,6'sında hipertansiyon mevcuttu.

İNS'li çocukların çoğunluğunu oluşturan SSNS hastalarının yaklaşık %40'ı sık relaps veya steroid bağımlı NS grubuna girmektedir (3). Hastaların %10-20'si ise steroide yanıt vermez (5). Çalışmamızda hastaların %43,2'si steroid yanıtlıydı. Steroid yanıtlı hastaların %36,8'i seyrek relaps NS iken, %63,2'si sık relaps veya steroid bağımlı NS tanıydı. Hastaların %56,8'i ise steroide dirençliydi. SRNS'li hasta oranındaki yükseklik yine çalışmaya dahil edilen hastaların böbrek biyopsisi yapılan NS'li hastalardan seçilmiş olmasına bağlıdır.

İNS tanılı hastaların çoğunluğu steroide yanıt verse de sık relaps ve steroide bağımlı NS'li hastalar steroidin uzun süreli kullanımına bağlı yan etkilere maruz kalırken, SRNS'li hastaların bir kısmı diğer immünsüpresiflere de dirençli olup KBH'ye ilerleyebilmektedir (2, 5). SRNS'li hastaların %50-70'i immünsüpresiflerle remisyon girmektedir. KBH'ye gidiş oranı %20-40 arasında değişmektedir (43, 138, 139). SRNS hastalarında NS tanısıyla böbrek fonksiyonlarında bozulmanın başlaması arasındaki süre genetik mutasyonun varlığında ortalama 45-48 ayda, genetik mutasyon olmadığında ortalama 58-205 ay arasında değişir (138, 140, 141). Bizim çalışmamızda SRNS'li hastaların %52'sinde KBH gelişmişti. Hastaların böbrek fonksiyonlarında bozulma ortalama  $28,76 \pm 15,05$  ayda başlamıştı. Bu süre genetik SRNS'de literatüre uyumlu olarak daha kısa iken ( $23,60 \pm 2,15$  ay) genetik olmayanlarda süre daha uzundu ( $41 \pm 11,27$  ay). KBH gelişmeyen hastaların takip süreleri ortalama  $62,05 \pm 37,00$  aydı.

Günümüzde özellikle SRNS tedavisi hala çocuk nefrologları için sorun oluşturmaya devam etmektedir. CD20 monoklonal antikor olan rituksimabın sık relaps veya steroid bağımlı NS'li hastaların tedavisinde başarılı olduğu gösterilmiş ve

KDIGO'da tedavi seçeneği olarak kabul edilmiştir (19). Rituksimab tedavisi SRNS ya da FSGS'li hastalarda da kullanılmaya başlanmıştır ancak remisyon oranları sık relaps veya steroid bağımlı NS'li hastalar kadar başarılı değildir (7).

Başlıca B lenfosit depleasyonu yapan rituksimabın bazı hastalarda B lenfosit depleasyonu yapmadan proteinüriyi engellediği, bazı hastalarda ise B hücre depleasyonu yaptığı halde remisyonu sağlayamadığı gösterilmiştir (142). Bazı çalışmalarda rituksimab verilerek B hücre depleasyonu sağlanan bazı hastalarda B hücre depleasyonu düzelse bile tekrar relaps gelişmediği farkedilmiştir. Bütün bunlardan yola çıkılarak NS'de rituksimabın B hücre depleasyonu dışında, siklosporine benzer şekilde podosit iskeleti üzerinden başka mekanizmalarla remisyonu sağlıyor olabileceği düşünülmüştür (8, 143).

SMPDL-3b podositlerde hücre zarı lipid yapısının içinde yer alır. Seramid sentezini sağlayarak podosit hücre iskeletinin düzenlenmesinde ve hücrelerarası sinyal iletiminde rol alır (59, 144). SMPDL-3b'nin, sfingomiyelinin seramide dönüşümünde gerekli ASMase aktivitesini arttırdığı ya da ASMase enzimine benzer etki gösterdiği bilinmektedir. SMPDL-3b eksikliği sfingomiyelin birikimine yol açarak aktin remodelingini olumsuz etkileyip podositleri apoptozise duyarlı hale getirir (129).

Rituksimab ilk olarak 2004 yılında NS tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (145). Son yıllarda yapılan çalışmalar CD20 monoklonal antikor olan rituksimabın B hücre depleasyonundan bağımsız, SMPDL-3b ekspresyonunda down regülasyonu engelleyerek ya da SMPDL-3b'ye bağlanarak proteinüriyi engellediğini göstermiştir (8, 130-132). İlk olarak 2011 yılında Fornoni vd. posttransplant FSGS nüksü görülen hastalarda SMPDL-3b immunfloresan (İFA) boyanmasının (tavşan poliklonal anti SMPDL3B antikor) nüks göstermeyen hastalara göre azaldığını göstermiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde normal insan serumu (n=5) ve rekürrens gösteren (n=12) ve göstermeyen (n=10) FSGS'li hastaların serumları verilerek oluşturulan hücre kültür çalışmasında; hücre kültürlerine rituksimab uygulanmış ve Real time PCR ile SMPDL-3b ekspresyonu değerlendirilmiştir. Çalışmada nüks gösteren podositlerde rituksimabın SMPDL-3b ekspresyonunun down regülasyonunu engellediği gösterilmiştir. Dolayısıyla rituksimabın FSGS'de SMPDL-3b ekspresyonunda azalmayı engelleyerek, SMPDL-3b'ye bağlanıp ASMase aktivitesini arttırdığı ve böylece proteinüriyi azalttığı tespit edilmiştir (132). Nüks göstermeyen ve normal podositlerde ise rituksimabın SMPDL-3b ekspresyonunu arttırmadığı gösterilmiştir.

Watanabe ve arkadaşlarının 2017 ve 2019 yıllarında kısıtlı vaka serisi ile yaptıkları çalışmalarda NS'de proteinüri mevcut iken idrarla SMPDL-3b atılımının azaldığı gösterilmiştir. Böbrek biyopsilerinde de atak döneminde SMPDL-3b (İFA) boyamalarının azaldığı gösterilmiştir. Rituksimab tedavisi ile remisyona giren nefrotik sendromlu hastaların idrarlarında SMPDL-3b düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Ancak sağlıklı çocuklarla karşılaştırıldığında NS'li çocukların idrarlarındaki SMPDL-3b atımları remisyon durumunda bile normalden düşük saptanmıştır. Çalışmanın sonunda da idrar SMPDL-3b atılımının rituksimab tedavisinin etkinliğinde yol gösterici olabileceği ileri sürülmüş ancak hasta sayıları az olduğu için bu iddianın spekülatif olduğunu kabul etmişlerdir (8, 130).

Takahashi ve arkadaşlarının farelerde adriamisin ile oluşturdukları nefrotik sendrom modelinde rituksimabın B hücre depleasyonu yapmadan SMPDL-3b'ye bağlanarak proteinüriyi azalttığı gösterilmiştir. Yazarlar ileri derecede podosit hasarının olduğu FSGS'li hastalıklarda rituksimabın bağlanacak SMPDL-3b bulamadığı için de bazı hastalarda etkisiz olabileceğini düşünmüşlerdir (131).

Rituksimabın B hücre depleasyonundan bağımsız podositte SMPDL-3b'ye bağlanarak etki ettiğini gösteren bu çalışmaların aksini savunan çalışma Alfred vd. tarafından yapılmıştır (146). Bu çalışmada NS patogenezinde T hücre disfonksiyonu ve dolaşan permeabilite faktörleri dışında B lenfositlerin antikor aracılı immuniteden bağımsız olarak rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. B lenfositlerin antijen sunan MHCII ekspresyonunu arttırarak T lenfositleri uyardığını veya direkt IL-4 gibi sitokin yapımı ile podosit hasarına yol açtığı belirtilmiştir. Çalışmada; B lenfositlerince üretilen IL-4'ün farelerde podosit ayaksı çıkıntılarında silinmeye ve proteinüriye yol açtığı gösterilmiştir. Rituksimabın SMPDL-3b'ye bağlanmadığı, antikor bağımsız mekanizmayla podositopati yapan B hücrelerini deplese ederek IL-4 üretimini azalttığı ve böylece proteinüriyi önlediğini ileri sürmüşlerdir (146).

Rituksimab ve SMPDL-3b ile ilişkili bu kısıtlı sayıdaki çalışmalardan yola çıkarak; tedavisi hala sorun olmaya devam eden özellikle SRNS ve FSGS'li hastalarda tedavi öncesi böbrek biyopsi preparatlarındaki SMPDL-3b düzeyi, başta rituksimab olmak üzere immunsupresif ilaçların klinik etkinliğinde yol gösterici olabilir mi ? sorusu ile çalışmamızı planladık. Çalışmamız insan böbrek biyopsi preparatlarında hem



immunhistokimyasal hem de Real time PCR ile SMPDL-3b mRNA ekspresyonuna bakılan literatürdeki ilk çalışmadır

Çalışmamıza dahil edilen 44 İNS hastasından 41'inin böbrek biyopsilerinde SMPDL-3b ekspresyonu Real time PCR yöntemi ile değerlendirildi. 37 hastaya ise Anti-SMPDL3B ile immunhistokimyasal inceleme yapıldı. Hastalar steroid, rituksimab ve diğer immunsupresif tedavi yanıtlarına göre, ek olarak mutasyon durumu ve remisyon durumuna göre gruplandırıldı. Real time PCR yöntemi ile SMPDL-3b mRNA ekspresyonu bu gruplar arasında karşılaştırıldı.

Steroid yanıtına göre değerlendirmede SSNS'li hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu SRNS'li hastalardan 1,021 kat daha fazlaydı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p değeri: 0,711, FC<1,5). Seyrek relaps NS hastalarında SMPDL-3b ekspresyonu sık relaps ve steroid bağımlı NS hastalarından 3,97 kat fazlaydı ve anlamlıydı (FC>1,5) ancak p değeri istatistiksel olarak anlamsızdı (p değeri: 0,635). Bu sonuçlar bize steroid duyarlı hasta grubunda özellikle SMPDL-3b artmış ekspresyonunun relapslar konusunda iyi yönde (düşük relaps) yol gösterici olabileceğini düşündürmüştür.

Rituksimab yanıtı 7 hastamızla rituksimab yanıtı 6 hastamızın SMPDL-3b ekspresyonlarını karşılaştırdığımızda; rituksimab yanıtı hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu yanıtı 6 hastamıza göre 1,089 kat fazlaydı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p değeri: 0,534, FC<1,5). Fornoni vd. prospektif çalışmasında transplantasyon sonrasında kısıtlı süre doku perfüzyonu beklenerek alınan biyopsilerin SMPDL-3b ekspresyonlarına bakılmış ve ardından rituksimab verilmişti. Takiplerinde nüks gelişen 8 hasta ile nüks gelişmeyen 12 hasta karşılaştırılmış, SMPDL-3b ekspresyonunun transplant sonrası FSGS nüksü olan hastalarda down regülasyonu gösterilmişti (132). Watanabe vd. çalışmasında idrar SMPDL-3b'nin glomeruler SMPDL-3b'nin indirekt göstergesi olabileceği öne sürülmüştür (8). Aynı yazar tarafından 2020 yılında daha fazla hastayla (n=31) çalışma yapılmış ve böbrek SMPDL-3b boyanması kontrol grubu ile benzer bulunmuştur (8, 132). SMPDL-3b ekspresyonunun rituksimab tedavisinde yol gösterici olup olmadığı ile ilgili çalışmamızda rituksimab yanıtı hastaların ekspresyonları rituksimab yanıtı 6 hastamıza göre 1,089 kat fazla olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yine steroid yanıtı hastalarda dirençli hastalara göre 1,021 kat fazla olsa da bu durum istatistiksel olarak yeterli düzeyde anlamlı değildi. KNİ yanıtı grupta SMPDL-3b ekspresyonu 1,127 kat (p:0,397), MMF yanıtı grupta ise SMPDL-3b ekspresyonu 1,44

kat ( $p:0,310$ ) fazlaydı ancak bu sonuçların hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $FC<1,5$ ). Sonuç olarak immünyüpresif tedavilere yanıtlı hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu yüksek ancak istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ( $FC<1,5$ ).

SRNS'li hastalardan genetik analiz yapıldı mutasyon saptanmayan grupta SMPDL-3b ekspresyonu 1,344 kat fazlaydı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p$  değeri: 0,13,  $FC<1,5$ )

Hastalar son klinik durumlarına göre remisyon ve KBH olarak sınıflandırıldı. Hastaların ilk başvuru anında GFR'leri normal iken yapılan böbrek biyopsilerinde; remisyonundaki hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu KBH'li hastalara göre 1,788 kat fazlaydı ve anlamlıydı ( $FC>1,5$ ) ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p: 0,846$ ). Remisyon durumuna göre karşılaştırdığımızda SMPDL-3b ekspresyonunun tam remisyonundaki hastalarda KBH'li hastalara göre daha fazla eksprese edildiğini gösterdik. Çalışmamızda ayrıca SRNS'li hastalar kendi içerisinde remisyon durumuna göre karşılaştırıldığında remisyonundaki hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu KBH'li hastalara göre 2,18 kat fazlaydı ve anlamlıydı ( $FC>1,5$ ) ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p$  değeri: 0,920).

SMPDL-3b ekspresyonunun rituksimab, steroid ve diğer immünyüpresif ilaç etkinliğinde yol gösterici olmadığını bulduk. Ancak SMPDL-3b ekspresyonunun hastaların prognozunda, tüm tedavilere yanıt ve KBH'ye gidişatta bir gösterge olabileceğini düşündük. Bu sonuçlar bize SMPDL-3b'nin aslında belli bir immünyüpresif ajana verilen yanıtın belirteci olmaktan çok hastalığın progresyonu konusunda işaretler veren bir belirteç olabileceğini düşündürmüştür. Özellikle tedavisi zor olan SRNS ya da FSGS'li hastalardan hangilerinin KBH'ye ilerleyeceğini tahmin etmede yol gösterici olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda anti-SMPDL3B boyanması hasta grupları arasında karşılaştırıldığında, SSNS'li hasta grubuyla SRNS'li hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p:0,155$ ). SSNS hastaları relaps durumuna göre değerlendirildiğinde seyrek relaps NS hasta grubu ile sık relaps ve steroid bağımlı NS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p:0,55$ ). Hastalar rituksimab yanıtına göre gruplandırıldığında rituksimaba yanıt veren hasta grubuyla rituksimab yanıtı olmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p:0,785$ ). Diğer immünyüpresifler tedavi yanıtına göre gruplandırıldığında MMF yanıtlı hastalarla MMF

yanıtsız hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p:0,941). KNİ yanıtlı hastalarla KNİ yanıtsız hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p:0,144). Yine hastaların progresyon durumlarına göre değerlendirildiğinde de; remisyondaki hastalar ile KBH gelişen hastalar arasında anti-SMPDL3B boyanmaları benzer bulunmuştur

Bu sonuçlar immunhistokimyasal yöntemlerle anti-SMPDL3B boyanmasının PCR yönteminden farklı olarak gerek immunsupresif tedavi yanıtında gerek hastalığın progresyonunda anlamlı ve güvenilir olmadığını düşündürmüştür.

## 5 SONUÇ

- 1) Çalışmamızda hastaların yaş ortalaması  $7,54 \pm 5,57$  (0,5-18) yıl, erkek/kız oranı 1,5 idi. Hastaların %13,6'sında hipertansiyon mevcuttu.
- 2) Hastaların %43,2'si steroid yanıtlıydı. Steroid yanıtlı hastaların %36,8'i seyrek relaps NS iken, %63,2'si sık relaps veya steroid bağımlı NS idi. Hastaların %56,8'i ise steroida dirençliydi.
- 3) Real time PCR yöntemi ile SMPDL-3b mRNA ekspresyonu gruplar arasında değerlendirildiğinde SMPDL-3b ekspresyonu SSNS'li hastalarda SRNS'li hastalardan 1,021 kat fazlaydı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $FC < 1,5$ ). Seyrek relaps NS hastalarında SMPDL-3b ekspresyonu sık relaps veya steroid bağımlı NS hastalarından 3,97 kat fazla ve anlamlıydı ( $FC > 1,5$ ) ancak p değeri istatistiksel olarak anlamsızdı.
- 4) İmmünespresif tedaviler karşılaştırıldığında;
  - Rituksimab yanıtlı hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu rituksimab yanıtsız hastalara göre 1,089 kat fazlaydı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.
  - KNİ yanıtlı grupta SMPDL-3b ekspresyonu 1,127 kat, MMF yanıtlı grupta ise SMPDL-3b ekspresyonu 1,44 kat fazlaydı ancak bu sonuçların hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı değildi.
  - İmmünespresif tedavilere yanıtta SMPDL-3b ekspresyonu yüksek ancak istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ( $FC < 1,5$ ).
- 5) SRNS'li hastalardan genetik analiz yapıp karşılaştırıldığında mutasyon saptanmayan grupta SMPDL-3b ekspresyonu 1,344 kat fazlaydı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.
- 6) Remisyonadaki hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu KBH'li hastalara göre 1,788 kat fazlaydı ve anlamlıydı ( $FC > 1,5$ ) ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p: 0,846$ ). SRNS'li hastalar remisyon durumuna göre karşılaştırıldığında remisyonadaki hastalarda SMPDL-3b ekspresyonu KBH'li hastalara göre 2,18 kat fazla ve anlamlıydı ( $FC > 1,5$ ) ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p: 0,920$ ).

- 7) Anti-SMPDL3B boyanması karşılaştırıldığında; rituksimab, KNI, MMF gibi immunsupresiflere yanıtı hastalar ile yanıtı hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Yine hastaların progresyon durumlarına göre değerlendirildiğinde de; remisyondaki hastalar ile KBH gelişen hastalar arasında anti-SMPDL3B boyanmaları benzer bulunmuştur.
- 8) Çalışmamız insan böbrek biyopsi preparatlarında hem immunhistokimyasal hem de moleküler PCR ile SMPDL-3b mRNA ekspresyonuna bakılan literatürdeki ilk çalışmadır.
- 9) Böbrek biyopsisinde SMPDL-3b ekspresyonunun başta rituksimab olmak üzere steroid dahil diğer immunsupresif ilaçların klinik etkinliğinde yol gösterici olmadığını bulduk.
- 10) Remisyon durumuna göre karşılaştırdığımızda SMPDL-3b ekspresyonunun tam remiyonlularda KBH'lilere göre daha fazla olduğunu gösterdik. Ayrıca SRNS'li hastalar kendi içerisinde remisyon durumuna göre karşılaştırıldığında SMPDL-3b ekspresyonunun remisyondaki hastalarda KBH'li hastalara göre 2,18 kat fazla olduğunu gösterdik.
- 11) Bu sonuçlar bize SMPDL-3b'nin aslında belli bir immunsupresif ajana verilen yanıtın belirteci olmaktan çok hastalığın progresyonu konusunda işaretler veren bir belirteç olabileceğini düşündürmüştür. Özellikle tedavisi zor olan SRNS ya da FSGS'li hastalardan hangilerinin KBH'ye ilerleyeceğini tahmin etmede yol gösterici olabileceğini düşündürmüştür.
- 12) Bu çalışma moleküler düzeyde SMPDL-3b ekspresyonunun İNS tedavisinde yeri konusuna doku düzeyinde çalışılarak katkıda bulunmuştur. SMPDL-3b ekspresyonunun NS hastalığında prognozla ilgili yol gösterici olduğunu, immunsupresif tedavilere yanıtın belirlenmesinde ileride yapılacak çalışmalar içinde hazırlayıcı olduğunu düşünmekteyiz.

## 6 KAYNAKLAR

1. Han KH, Kim SH. Recent Advances in Treatments of Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis in Children. *Biomed Res Int*. 2016;2016:3053706.
2. Iijima K, Sako M, Nozu K. Rituximab for nephrotic syndrome in children. *Clin Exp Nephrol*. 2017;21(2):193-202.
3. Ehrich JH, Pape L, Schiffer M. Corticosteroid-resistant nephrotic syndrome with focal and segmental glomerulosclerosis : an update of treatment options for children. *Paediatr Drugs*. 2008;10(1):9-22.
4. Cattran DC, Feehally J, Cook HT, Liu ZH, Fervenza FC, Mezzano SA, et al. Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) glomerulonephritis work group. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Kidney International Supplements*. 2012;2(2):139-274.
5. Koskimies O, Vilksa J, Rapola J, Hallman N. Long-term outcome of primary nephrotic syndrome. *Arch Dis Child*. 1982;57(7):544-8.
6. Girişgen İ, Yüksel S, Pekal Y. Rituximab experience in children with nephrotic syndrome: what have we observed differently. *Turk Pediatri Ars*. 2020;55(1):60-6.
7. Kallash M, Smoyer WE, Mahan JD. Rituximab Use in the Management of Childhood Nephrotic Syndrome. *Front Pediatr*. 2019;7:178.
8. Watanabe S, Tsugawa K, Tsuruga K, Imaizumi T, Tanaka H. Urinary excretion of sphingomyelinase phosphodiesterase acid-like 3b in children with intractable nephrotic syndrome. *Pediatr Int*. 2017;59(10):1112-5.
9. Madrazo-Ibarra A, Vaitla P. Histology, Nephron. *StatPearls [Internet]*. 2020.
10. Arınsoy PDT. BÖBREK FİZYOLOJİSİ. Prof. Dr. Turgay Arınsoy DDÖG, Doç. Dr. İsmail Koçyiğit, editor2017.
11. Reiser J, Altintas MM. Podocytes. *F1000Res*. 2016;5.
12. Blouch K, Deen WM, Fauvel JP, Bialek J, Derby G, Myers BD. Molecular configuration and glomerular size selectivity in healthy and nephrotic humans. *Am J Physiol*. 1997;273(3 Pt 2):F430-7.
13. Burton C, Harris KP. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis*. 1996;27(6):765-75.
14. Simic I, Tabatabaeifar M, Schaefer F. Animal models of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2013;28(11):2079-88.
15. Rüveyda GÜLMEZ FLS. Nefrotik Sendromun Etyolojisi, Klinik Belirtileri, Tanısı. Nefrotik sendromun etyolojisi, klinik belirtileri, tanısı [Internet]. 2021; 1.
16. Wang C-s, Greenbaum LA. Nephrotic syndrome. *Pediatric Clinics*. 2019;66(1):73-85.
17. Noone DG, Iijima K, Parekh R. Idiopathic nephrotic syndrome in children. *The Lancet*. 2018;392(10141):61-74.
18. Noone DG, Iijima K, Parekh R. Idiopathic nephrotic syndrome in children. *Lancet*. 2018;392(10141):61-74.
19. Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int*. 1978;13(2):159-65.
20. Srivastava T, Simon SD, Alon US. High incidence of focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic syndrome of childhood. *Pediatr Nephrol*. 1999;13(1):13-8.
21. for KCPG, Suppl GKi. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl*2012.
22. El Bakkali L, Rodrigues Pereira R, Kuik DJ, Ket JC, van Wijk JA. Nephrotic syndrome in The Netherlands: a population-based cohort study and a review of the literature. *Pediatr Nephrol*. 2011;26(8):1241-6.

23. McKinney PA, Feltbower RG, Brocklebank JT, Fitzpatrick MM. Time trends and ethnic patterns of childhood nephrotic syndrome in Yorkshire, UK. *Pediatr Nephrol.* 2001;16(12):1040-4.
24. Etiology, clinical manifestations, and diagnosis of nephrotic syndrome in children. In Kim MS (ed.) *upToDate 2019. Etiology, clinical manifestations, and diagnosis of nephrotic syndrome in children.* In Kim MS (ed.) *upToDate 2019.* Niaudet P 2019.
25. Borges FF, Shiraichi L, da Silva MPH, Nishimoto EI, Nogueira PCK. Is focal segmental glomerulosclerosis increasing in patients with nephrotic syndrome? *Pediatric Nephrology.* 2007;22(9):1309-13.
26. Hogg RJ, Portman RJ, Milliner D, Lemley KV, Eddy A, Ingelfinger J. Evaluation and management of proteinuria and nephrotic syndrome in children: recommendations from a pediatric nephrology panel established at the National Kidney Foundation conference on proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, and elimination (PARADE). *Pediatrics.* 2000;105(6):1242-9.
27. Shalhoub R. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *The Lancet.* 1974;304(7880):556-60.
28. Vivarelli M, Massella L, Ruggiero B, Emma F. Minimal Change Disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(2):332-45.
29. Fornoni A, Sageshima J, Wei C, Merscher-Gomez S, Aguillon-Prada R, Jauregui AN, et al. Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Science translational medicine.* 2011;3(85):85ra46-85ra46.
30. Clement LC, Avila-Casado C, Macé C, Soria E, Bakker WW, Kersten S, et al. Podocyte-secreted angiopoietin-like-4 mediates proteinuria in glucocorticoid-sensitive nephrotic syndrome. *Nature medicine.* 2011;17(1):117-22.
31. McCarthy ET, Sharma M, Savin VJ. Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2010;5(11):2115-21.
32. Sinha A, Bajpai J, Saini S, Bhatia D, Gupta A, Puraswani M, et al. Serum-soluble urokinase receptor levels do not distinguish focal segmental glomerulosclerosis from other causes of nephrotic syndrome in children. *Kidney International.* 2014;85(3):649-58.
33. Maas RJ, Wetzels JF, Deegens JK. Serum suPAR concentrations in patients with focal segmental glomerulosclerosis with end-stage renal disease. *Kidney international.* 2014;85(3):711.
34. Agrawal S, Zaritsky JJ, Fornoni A, Smoyer WE. Dyslipidaemia in nephrotic syndrome: mechanisms and treatment. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(1):57-70.
35. Hari P, Khandelwal P, Smoyer WE. Dyslipidemia and cardiovascular health in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2020;35(9):1601-19.
36. Neslihan GÜNAY İD. Nefrotik Sendrom Komplikasyonları-II Hiperkoagülopati, Lipid Bozuklukları, Endokrin Disfonksiyon. 1: aErciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Nefrolojisi BD, Kayseri, TÜRKİYE; 2021.
37. Meyrier A, Niaudet P. Acute kidney injury complicating nephrotic syndrome of minimal change disease. *Kidney Int.* 2018;94(5):861-9.
38. Morales P, Hamilton K, Brown J, Hotchkiss RS. Open renal biopsy. *J Urol.* 1961;86:501-3.
39. Metcalf J. Needles for percutaneous renal biopsy in infants and children. *Pediatrics.* 1970;46(5):788-9.
40. Walker PD, Cavallo T, Bonsib SM. Practice guidelines for the renal biopsy. *Mod Pathol.* 2004;17(12):1555-63.
41. Corwin HL, Schwartz MM, Lewis EJ. The importance of sample size in the interpretation of the renal biopsy. *Am J Nephrol.* 1988;8(2):85-9.
42. Hatice EREN ÖZTÜRK ME. İdiyopatik nefrotik sendrom tedavisi. *Çocuklarda Nefrotik Sendrom [Internet].* 2021 1; 1(1):[1 p.].

43. Lombel RM, Gipson DS, Hodson EM. Treatment of steroid-sensitive nephrotic syndrome: new guidelines from KDIGO. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(3):415-26.
44. Lombel RM, Hodson EM, Gipson DS. Treatment of steroid-resistant nephrotic syndrome in children: new guidelines from KDIGO. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(3):409-14.
45. Saadeh SA, Baracco R, Jain A, Kapur G, Mattoo TK, Valentini RP. Weight or body surface area dosing of steroids in nephrotic syndrome: is there an outcome difference? *Pediatr Nephrol.* 2011;26(12):2167-71.
46. Hodson EM, Hahn D, Craig JC. Corticosteroids for the initial episode of steroid-sensitive nephrotic syndrome. Springer; 2015.
47. Short versus standard prednisone therapy for initial treatment of idiopathic nephrotic syndrome in children. Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie. *Lancet.* 1988;1(8582):380-3.
48. Yel S. Düşünsel R BF, editör. *Glomerüler Hastalıklar* Düşünsel R BF, editor. kayseri: 84-7; 2018.
49. He F-F, Chen S, Su H, Meng X-F, Zhang C. Actin-associated Proteins in the Pathogenesis of Podocyte Injury. *Current genomics.* 2013;14:477-84.
50. Bora GÜLHAN RT. Steroide dirençli nefrotik sendrom tedavisi. *Çocuklarda Nefrotik Sendrom [Internet].* 2021; 1.
51. Griswold W, Tune B, Reznik V, Vazquez M, Prime D, Brock P, et al. Treatment of childhood prednisone-resistant nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis with intravenous methylprednisolone and oral alkylating agents. *Nephron.* 1987;46(1):73-7.
52. Mendoza SA, Reznik VM, Griswold WR, Krensky AM, Yorgin PD, Tune BM. Treatment of steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis with pulse methylprednisolone and alkylating agents. *Pediatric nephrology.* 1990;4(4):303-7.
53. Latta K, von Schnakenburg C, Ehrich JH. A meta-analysis of cytotoxic treatment for frequently relapsing nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol.* 2001;16(3):271-82.
54. Garabed Eknayan M, Norbert Lameire, MD, PhD. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerulonephritis Work Group. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis*2012.
55. Wang W, Xia Y, Mao J, Chen Y, Wang D, Shen H, et al. Treatment of tacrolimus or cyclosporine A in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology.* 2012;27(11):2073-9.
56. Iijima K, Hamahira K, Tanaka R, Kobayashi A, Nozu K, Nakamura H, et al. Risk factors for cyclosporine-induced tubulointerstitial lesions in children with minimal change nephrotic syndrome. *Kidney international.* 2002;61(5):1801-5.
57. Mekahli D, Liutkus A, Ranchin B, Yu A, Bessenay L, Girardin E, et al. Long-term outcome of idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome: a multicenter study. *Pediatr Nephrol.* 2009;24(8):1525-32.
58. Basu B, Mahapatra TK, Mondal N. Mycophenolate Mofetil Following Rituximab in Children With Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Pediatrics.* 2015;136(1):e132-9.
59. Merscher S, Fornoni A. Podocyte Pathology and Nephropathy – Sphingolipids in Glomerular Diseases. *Frontiers in Endocrinology.* 2014;5(127).
60. Perosa F, Favoino E, Caragnano MA, Dammacco F. Generation of biologically active linear and cyclic peptides has revealed a unique fine specificity of rituximab and its possible cross-reactivity with acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor. *Blood.* 2006;107(3):1070-7.
61. Kamei K, Ishikura K, Sako M, Ito S, Nozu K, Iijima K. Rituximab therapy for refractory steroid-resistant nephrotic syndrome in children. *Pediatric Nephrology.* 2020;35(1):17-24.
62. Guignon V, Dallochio A, Baudouin V, Dehennault M, Hachon-Le Camus C, Afanetti M, et al. Rituximab treatment for severe steroid-or cyclosporine-dependent nephrotic syndrome: a multicentric series of 22 cases. *Pediatric Nephrology.* 2008;23(8):1269-79.



63. Lee JM, Kronbichler A, Shin JI, Oh J. Current understandings in treating children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology*. 2021;36(4):747-61.
64. Kitabı ÇNE. Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL DDFB, editor: p. 84-7; 2018.
65. Tarshish P, Tobin JN, Bernstein J, Edelmann C. Prognostic significance of the early course of minimal change nephrotic syndrome: report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1997;8(5):769-76.
66. Hodson EM, Knight JF, Willis NS, Craig JC. Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005(1):Cd001533.
67. El-Husseini A, El-Basuony F, Mahmoud I, Sheashaa H, Sabry A, Hassan R, et al. Long-term effects of cyclosporine in children with idiopathic nephrotic syndrome: a single-centre experience. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2005;20(11):2433-8.
68. Hulton S-A, Neuhaus TJ, Dillon MJ, Barratt TM. Long-term cyclosporin A treatment of minimal-change nephrotic syndrome of childhood. *Pediatric Nephrology*. 1994;8(4):401-3.
69. Ishikura K, Yoshikawa N, Nakazato H, Sasaki S, Iijima K, Nakanishi K, et al. Two-year follow-up of a prospective clinical trial of cyclosporine for frequently relapsing nephrotic syndrome in children. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2012;7(10):1576-83.
70. Dorresteijn EM, Kist-van Holthe JE, Levtchenko EN, Nauta J, Hop WC, van der Heijden AJ. Mycophenolate mofetil versus cyclosporine for remission maintenance in nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2008;23(11):2013-20.
71. Gellermann J, Weber L, Pape L, Tönshoff B, Hoyer P, Querfeld U. Mycophenolate mofetil versus cyclosporin A in children with frequently relapsing nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(10):1689-97.
72. Hahn D, Farquhar J, Koh Y, editors. Efficacy of two versus four doses of rituximab for childhood nephrotic syndrome. *NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION*; 2018: OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND.
73. Kari JA, El-Morshedy SM, El-Desoky S, Alshaya HO, Rahim KA, Edrees BM. Rituximab for refractory cases of childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2011;26(5):733-7.
74. Salama AD, Pusey CD. Drug insight: rituximab in renal disease and transplantation. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006;2(4):221-30.
75. Tullus K, Webb H, Bagga A. Management of steroid-resistant nephrotic syndrome in children and adolescents. *The Lancet Child & Adolescent Health*. 2018;2(12):880-90.
76. Niaudet P, Gagnadoux M, Broyer M. Treatment of childhood steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome. *Advances in nephrology from the Necker Hospital*. 1998;28:43-61.
77. Primary nephrotic syndrome in children: clinical significance of histopathologic variants of minimal change and of diffuse mesangial hypercellularity. A Report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int*. 1981;20(6):765-71.
78. Trautmann A, Vivarelli M, Samuel S, Gipson D, Sinha A, Schaefer F, et al. IPNA clinical practice recommendations for the diagnosis and management of children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology*. 2020;35(8):1529-61.
79. Trautmann A, Lipska-Ziętkiewicz BS, Schaefer F. Exploring the clinical and genetic spectrum of steroid resistant nephrotic syndrome: The PodoNet registry. *Frontiers in pediatrics*. 2018;6:200.
80. Li S, Yang H, Guo P, Ao X, Wan J, Li Q, et al. Efficacy and safety of immunosuppressive medications for steroid-resistant nephrotic syndrome in children: a systematic review and network meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(42):73050.
81. Choudhry S, Bagga A, Hari P, Sharma S, Kalaivani M, Dinda A. Efficacy and safety of tacrolimus versus cyclosporine in children with steroid-resistant nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. *American journal of kidney diseases*. 2009;53(5):760-9.
82. Basu B, Mahapatra T, Mondal N. Mycophenolate mofetil following rituximab in children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatrics*. 2015;136(1):e132-e9.

83. Sinha A, Bhatia D, Gulati A, Rawat M, Dinda AK, Hari P, et al. Efficacy and safety of rituximab in children with difficult-to-treat nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(1):96-106.
84. Topaloğlu R, Gülhan B, Çeleğen K, İnözü M, Hayran M, Düzova A, et al. Rituximab for Children With Difficult-to-Treat Nephrotic Syndrome: Its Effects on Disease Progression and Growth. *Front Pediatr*. 2019;7:313.
85. Magnasco A, Ravani P, Edefonti A, Murer L, Ghio L, Belingheri M, et al. Rituximab in children with resistant idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(6):1117-24.
86. Bagga A, Sinha A, Moudgil A. Rituximab in patients with the steroid-resistant nephrotic syndrome. *N Engl J Med*. 2007;356(26):2751-2.
87. Prytuła A, Iijima K, Kamei K, Geary D, Gottlich E, Majeed A, et al. Rituximab in refractory nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(3):461-8.
88. Ito S, Kamei K, Ogura M, Udagawa T, Fujinaga S, Saito M, et al. Survey of rituximab treatment for childhood-onset refractory nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2013;28(2):257-64.
89. Kamei K, Okada M, Sato M, Fujimaru T, Ogura M, Nakayama M, et al. Rituximab treatment combined with methylprednisolone pulse therapy and immunosuppressants for childhood steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2014;29(7):1181-7.
90. Ding WY, Saleem MA. Current concepts of the podocyte in nephrotic syndrome. *Kidney Res Clin Pract*. 2012;31(2):87-93.
91. Andrews PM. Investigations of cytoplasmic contractile and cytoskeletal elements in the kidney glomerulus. *Kidney Int*. 1981;20(5):549-62.
92. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*. 2003;83(1):253-307.
93. Sever S, Schiffer M. Actin dynamics at focal adhesions: a common endpoint and putative therapeutic target for proteinuric kidney diseases. *Kidney Int*. 2018;93(6):1298-307.
94. Srivastava T, Dai H, Heruth DP, Alon US, Garola RE, Zhou J, et al. Mechanotransduction signaling in podocytes from fluid flow shear stress. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;314(1):F22-f34.
95. Bora GÜLHAN FÖ. Nefrotik Sendrom ve Genetik. GÜLHAN B, editor 2021 2021.
96. Blaine J, Dylewski J. Regulation of the Actin Cytoskeleton in Podocytes. *Cells*. 2020;9(7).
97. Saleem MA, Ni L, Witherden I, Tryggvason K, Ruotsalainen V, Mundel P, et al. Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *Am J Pathol*. 2002;161(4):1459-66.
98. Kriz W, Lemley KV. Potential relevance of shear stress for slit diaphragm and podocyte function. *Kidney Int*. 2017;91(6):1283-6.
99. Martin CE, Jones N. Nephrin Signaling in the Podocyte: An Updated View of Signal Regulation at the Slit Diaphragm and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:302.
100. Succar L, Boadle RA, Harris DC, Rangan GK. Formation of tight junctions between neighboring podocytes is an early ultrastructural feature in experimental crescentic glomerulonephritis. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2016;9:297-312.
101. Kurihara H, Anderson JM, Kerjaschki D, Farquhar MG. The altered glomerular filtration slits seen in puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate-treated rats contain the tight junction protein ZO-1. *Am J Pathol*. 1992;141(4):805-16.
102. Denhez B, Geraldès P. Regulation of Nephrin Phosphorylation in Diabetes and Chronic Kidney Injury. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;966.
103. Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(4):918-26.
104. Cil O, Besbas N, Duzova A, Topaloglu R, Peco-Antić A, Korkmaz E, et al. Genetic abnormalities and prognosis in patients with congenital and infantile nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology*. 2015;30(8):1279-87.

105. Huber TB, Simons M, Hartleben B, Sernetz L, Schmidts M, Gundlach E, et al. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet.* 2003;12(24):3397-405.
106. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest.* 2001;108(11):1621-9.
107. Ha TS. Roles of adaptor proteins in podocyte biology. *World J Nephrol.* 2013;2(1):1-10.
108. Tossidou I, Teng B, Worthmann K, Müller-Deile J, Jobst-Schwan T, Kardinal C, et al. Tyrosine Phosphorylation of CD2AP Affects Stability of the Slit Diaphragm Complex. *J Am Soc Nephrol.* 2019;30(7):1220-37.
109. Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science.* 1999;286(5438):312-5.
110. Löwik MM, Groenen PJ, Pronk I, Lilien MR, Goldschmeding R, Dijkman HB, et al. Focal segmental glomerulosclerosis in a patient homozygous for a CD2AP mutation. *Kidney Int.* 2007;72(10):1198-203.
111. Takano T, Bareke E, Takeda N, Aoudjit L, Baldwin C, Pisano P, et al. Recessive mutation in CD2AP causes focal segmental glomerulosclerosis in humans and mice. *Kidney Int.* 2019;95(1):57-61.
112. Mundel P, Gilbert P, Kriz W. Podocytes in glomerulus of rat kidney express a characteristic 44 KD protein. *J Histochem Cytochem.* 1991;39(8):1047-56.
113. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol.* 2006;8(5):485-91.
114. Bartram MP, Habbig S, Pahmeyer C, Höhne M, Weber LT, Thiele H, et al. Three-layered proteomic characterization of a novel ACTN4 mutation unravels its pathogenic potential in FSGS. *Hum Mol Genet.* 2016;25(6):1152-64.
115. Suleiman HY, Roth R, Jain S, Heuser JE, Shaw AS, Miner JH. Injury-induced actin cytoskeleton reorganization in podocytes revealed by super-resolution microscopy. *JCI Insight.* 2017;2(16).
116. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2000;24(3):251-6.
117. Meng L, Cao S, Lin N, Zhao J, Cai X, Liang Y, et al. Identification of a Novel ACTN4 Gene Mutation Which Is Resistant to Primary Nephrotic Syndrome Therapy. *Biomed Res Int.* 2019;2019:5949485.
118. Henderson JM, Al-Waheeb S, Weins A, Dandapani SV, Pollak MR. Mice with altered alpha-actinin-4 expression have distinct morphologic patterns of glomerular disease. *Kidney Int.* 2008;73(6):741-50.
119. Kos CH, Le TC, Sinha S, Henderson JM, Kim SH, Sugimoto H, et al. Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest.* 2003;111(11):1683-90.
120. Dietrich A, Gudermann T. TRPC6. *Handb Exp Pharmacol.* 2007(179):125-41.
121. Dryer SE, Reiser J. TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(4):F689-701.
122. Jiang L, Ding J, Tsai H, Li L, Feng Q, Miao J, et al. Over-expressing transient receptor potential cation channel 6 in podocytes induces cytoskeleton rearrangement through increases of intracellular Ca<sup>2+</sup> and RhoA activation. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011;236(2):184-93.
123. Sachs N, Sonnenberg A. Cell-matrix adhesion of podocytes in physiology and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(4):200-10.
124. Goñi FM, Alonso A. Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2009;1788(1):169-77.
125. Zhang Y, Li X, Becker KA, Gulbins E. Ceramide-enriched membrane domains—Structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2009;1788(1):178-83.

126. Merscher S, Fornoni A. Podocyte pathology and nephropathy - sphingolipids in glomerular diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:127.
127. Steffes MW, Schmidt D, McCrery R, Basgen JM. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney International*. 2001;59(6):2104-13.
128. Verzola D, Gandolfo MT, Ferrario F, Rastaldi MP, Villaggio B, Gianiorio F, et al. Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy. *Kidney International*. 2007;72(10):1262-72.
129. Bezombes C, Grazide S, Garret C, Fabre C, Quillet-Mary A, Müller S, et al. Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood*. 2004;104(4):1166-73.
130. Watanabe S, Hirono K, Aizawa T, Tsugawa K, Joh K, Imaizumi T, et al. Podocyte sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3b decreases among children with idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Exp Nephrol*. 2021;25(1):44-51.
131. Takahashi Y, Ikezumi Y, Saitoh A. Rituximab protects podocytes and exerts anti-proteinuric effects in rat adriamycin-induced nephropathy independent of B-lymphocytes. *Nephrology (Carlton)*. 2017;22(1):49-57.
132. Fornoni A, Sageshima J, Wei C, Merscher-Gomez S, Aguillon-Prada R, Jauregui AN, et al. Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Sci Transl Med*. 2011;3(85):85ra46.
133. Chan AC. Rituximab's new therapeutic target: the podocyte actin cytoskeleton. *Sci Transl Med*. 2011;3(85):85ps21.
134. Schwartz GJ, Brion LP, Spitzer A. The use of plasma creatinine concentration for estimating glomerular filtration rate in infants, children, and adolescents. *Pediatr Clin North Am*. 1987;34(3):571-90.
135. Kaymaz BT, Günel NS, Ceyhan M, Çetintaş VB, Özel B, Yandım MK, et al. Revealing genome-wide mRNA and microRNA expression patterns in leukemic cells highlighted "hsa-miR-2278" as a tumor suppressor for regain of chemotherapeutic imatinib response due to targeting STAT5A. *Tumour Biol*. 2015;36(10):7915-27.
136. Tokgun PE, Tokgun O, Kurt S, Tomatir AG, Akca H. MYC-driven regulation of long non-coding RNA profiles in breast cancer cells. *Gene*. 2019;714:143955.
137. Shatat IF, Becton LJ, Woroniecki RP. Hypertension in Childhood Nephrotic Syndrome. *Front Pediatr*. 2019;7:287.
138. Trautmann A, Vivarelli M, Samuel S, Gipson D, Sinha A, Schaefer F, et al. IPNA clinical practice recommendations for the diagnosis and management of children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2020;35(8):1529-61.
139. Tullus K, Webb H, Bagga A. Management of steroid-resistant nephrotic syndrome in children and adolescents. *Lancet Child Adolesc Health*. 2018;2(12):880-90.
140. Trautmann A, Schnaidt S, Lipska-Ziętkiewicz BS, Bodria M, Ozaltın F, Emma F, et al. Long-Term Outcome of Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome in Children. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(10):3055-65.
141. Büscher AK, Kranz B, Büscher R, Hildebrandt F, Dworniczak B, Pennekamp P, et al. Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(11):2075-84.
142. Sato M, Kamei K, Ogura M, Ishikura K, Ito S. Relapse of nephrotic syndrome during post-rituximab peripheral blood B-lymphocyte depletion. *Clinical and experimental nephrology*. 2018;22(1):110-6.
143. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med*. 2008;14(9):931-8.
144. Abou Daher A, El Jalkh T, Eid AA, Fornoni A, Marples B, Zeidan YH. Translational aspects of sphingolipid metabolism in renal disorders. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(12):2528.

145. Benz K, Dötsch J, Rascher W, Stachel D. Change of the course of steroid-dependent nephrotic syndrome after rituximab therapy. *Pediatric Nephrology*. 2004;19(7):794-7.
146. Kim AH, Chung JJ, Akilesh S, Koziell A, Jain S, Hodgins JB, et al. B cell-derived IL-4 acts on podocytes to induce proteinuria and foot process effacement. *JCI Insight*. 2017;2(21).