



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI

SIÇANLARDA TEK TARAFLI OBSTRÜKSİYON MODELİNDE
APELİN VE APELİN RESEPTÖR ANTAGONİSTİ ALA-APELİNİN
RENAL FİBROZİS ÜZERİNE ETKİLERİ

DR. GÜRDAL BİRDAL
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. MEHMET KOÇ

İSTANBUL 2014

İÇİNDEKİLER

	Sayfalar
ÖNSÖZ.....	ii
ÖZET.....	iii
İNGİLİZCE ÖZET.....	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2-20
2.1. Kronik Böbrek Hastalığı ve Renal Fibrozis.....	2
2.2. Üreter Obstrüksiyonu ve Kronik Böbrek Yetmezliği.....	2-3
2.3. Böbrek Fibrozis Gelişimini İncelemede Üreter Obstrüksiyon Modeli.....	3-4
2.4. UO Modelinde Fibrozis Gelişiminde Patogenetik Mekanizmalar.....	4-11
2.4.1. UO Sırasında Tübüler Epiteli Etkileyen Stres Faktörleri.....	5-6
2.4.2. Tübüler Bazal Membran Degredasyonu.....	7
2.4.3. UO Modelinde Fibroze Yol Açan Hücreler ve Medyatörler.....	7-11
2.4.3.1 Fibroblastlar, Myofibroblastlar ve EMT.....	7-8
2.4.3.2 Lokal İnterstisyel Fibroblastların Aktivasyonu.....	8-9
2.4.3.3 Monositler ve Makrofajlar.....	9
2.4.3.4 Dendritik Hücreler ve Lenfatik Sistem.....	9-10
2.4.3.5. Mast Hücreleri.....	10
2.4.3.6. Lenfositler.....	10
2.4.3.7. Sitokinler.....	11
2.4.4. UO'da Apoptozis ve Fibrozisle İlişkisi.....	11-15
2.4.5. UO Sonrası Oksidatif Stres ve Fibrozis.....	15-16
2.5. Apelin: Yapısı ve Fonksiyonları.....	16-20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21-26
4. BULGULAR.....	27-38
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	39-43
6. KAYNAKÇA.....	44-54
7. ETİKKURUL ONAYI.....	55

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitim sürem boyunca iyi bir klinisyen olmamız için uğraşan başta Prof. Dr. İ.Çetin Özener hocama ve Prof. Dr. Serhan Tuğlular hocama,

Tez çalışmam süresince her aşamada destek olan, titiz ve disiplinli çalışmasıyla değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Koç'a,

Esprili çalışma anlayışı ve destekleri için Doç. Dr. İ. Hakkı Arıkan'a,

Asistanlığım boyunca destek olan Doç.Dr. Arzu Kahveci ve Doç. Dr.Ebru Aşıcıoğlu'na, çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr.Derya Güler'e, Uzm. Dr. Dilek Ataş Barutçu'ya,

Tüm hemşire, teknisyen ve personel arkadaşlarıma

Tez çalışmamın bütün aşamalarında çok değerli katkılarını aldığım Fizyoloji A.B.D.'nden Prof. Dr. Berrak Yeğen'e, doktora öğrencileri Zarife Nigar Özdemir ve Vet. Hek. Dilek Özbeyli'ye, Histoloji A.B.D.'nden Prof. Dr. Şule Çetinel ve doktora öğrencisi Naziye Özkan'a, İmmünoloji A.B.D'ından Yrd. Doç. Dr. Aysin Tulunay'a, Gastroenteroloji B.D'ndan Prof. Dr. Neşe İmeryüz'e, İç Hastalıkları A.B.D. uzmanlık öğrencisi Dr. Neslihan Tezcan'a teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca kendilerini bana yardım etmeye adanmış annem ve aramızda olmayan babam başta olmak üzere tüm aileme, asistanlık sırasındaki yoğun ve yorucu çalışmamdan dolayı, birlikte geçirdiğimiz vakitten en çok çaldığım, bana hep destek olan eşim Nilay, oğlum Barış ve kızım Deniz'e

Ayrıca eşsiz ve çok değerli ülkemizin ağaçlarına, suyuna, toprağına, parklarına, umudun simgesi tertemiz çocuklarına ve o çocukların gözlerindeki ışıltıya sonsuz teşekkürü, ödeyipte bitiremeyeceğim bir borç bilirim.

4 Nisan 2014

Uzm.Dr. Gürdal BİRDAL

ÖZET

Sıçanlarda Tek Taraflı Obstrüksiyon Modelinde Apelin ve Apelin Reseptör Antagonisti Ala-Apelinin Renal Fibrozis Üzerine Etkileri

AMAÇ: Tek taraflı üreter obstrüksiyonu (UUO) iyi bilinen bir renal fibrozis modeli olup obstrükte böbrekte tübüler hasar ve interstisyel inflamasyonla karakterizedir.

Apelin, APJ reseptörünün endojen ligandı olarak tanımlanmış bir peptid olup kardiyovasküler sistemde anti-fibrotik etkilerinin olduğu, buna karşın APJ reseptör blokajının ise hepatik fibrozisi azalttığı ve anjiyogenesisi baskıladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte apelin sisteminin UUO modelindeki direk etkileri henüz çalışılmamıştır. Bu çalışmada, apelinin ve/veya APJ reseptör antagonisti ala-apelinin, UUO modelinde inflamasyon ve fibrozis gelişimini baskılayıp baskılamadığını incelemeyi amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM: Erkek Wistar albino sıçanlara ketamin anestezisi (100 mg/kg; intraperitoneal, ip) altında sol üreterleri bağlanarak UUO yapıldı. Bir grup sıçana ise sol üreterlerine bağlama yapılmaksızın abdominal inzsizyon yapıldı (kontrol grubu). Sıçanlara günlük ip serum fizyolojik (SF, grubu, n=8) veya apelin (50 µg/kg/gün, apelin grubu, n=8) veya apelin reseptör antagonisti ala-apelin (75 µg/kg/gün, ala-apelin grubu, n=8) 7 gün süreyle uygulandı. Kontrol grubuna ise 7 gün boyunca ip serum fizyolojik enjekte edildi. Yedinci günün bitiminde UUO uygulanan böbrek çıkartılarak flow sitometrik analiz için lökositler izole edildi ve böbrek dokusu histopatolojik değerlendirmeler için ayrıldı.

BULGULAR: Obstrükte böbreği infiltre eden CD3⁺ T-lenfositler, CD4⁺ T-lenfositler, CD8⁺ T-lenfositlerin yüzdesi ve CD3⁺/CD8⁺ oranı SF, apelin ve ala-apelin ile tedavi edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttı. CD4⁺ T-lenfositlerin yüzdesi apelin grubunda, CD3⁺/CD8⁺ oranı ise hem apelin hem de ala-apelin grubunda SF grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı. α-SMA ekspresyonu SF grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttı. Buna karşın, α-SMA ekspresyonu apelin ve ala-apelin gruplarında SF grubuna kıyasla anlamlı olarak baskılandı. Masson-trikrom boyası ile belirlenen fibrozis skoru SF grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmakla birlikte apelin ve ala-apelin gruplarında fibrozis skorunda baskılanma izlenmedi.

SONUÇ: Bulgularımız α -SMA ekspresyonunun apelin ve ala-apelin gruplarında baskılandığını göstermektedir. Apelin uygulanması yada APJ reseptörünün ala-apelin ile blokajı UUO modelinde fibrozis gelişimini önlemedi. Buna karşın, apelin uygulaması ile CD4⁺ T-lenfosit infiltrasyonunda izlenen baskılanma obstrüksiyona bağlı tübüler hasarı önlemede potansiyel rol oynayabilir.

Anahtar kelimeler, tek taraflı üreter obstrüksiyonu, renal fibrozis, apelin, ala-apelin,

İNGİLİZCE ÖZET

Effect of Apelin and Apelin Receptor Antagonist Ala-Apelin on Renal Fibrosis in Unilateral Ureter Obstruction Model in Rats

BACKGROUND: Unilateral ureteral obstruction (UUO) is a well-characterized fibrosis model exhibiting tubular injury and interstitial inflammation in the obstructed kidney. Apelin, a peptide identified as the endogenous ligand of the human orphan G-protein-coupled receptor (APJ), is reported to have anti-fibrotic and anti-inflammatory actions in the cardiovascular system, while the blockade of APJ receptor was shown to be effective in reducing hepatic fibrosis and angiogenesis. However, the role of Apelin in the development of UUO model has not yet been elucidated. In this study, we aimed to determine the possible beneficial effects of of apelin or ala-apelin in renal fibrosis by using UUO model.

METHODS: In male Wistar albino rats under ketamine anesthesia (100 mg/kg; intraperitoneally, ip) UUO was performed by ligating left ureters. The rats were injected ip with either saline (SF group, n=8) or apelin (50 µg/kg/day, apelin group, n=8) or the apelin receptor blocker ala-apelin (75 µg/kg/day, ala-apelin group, n=8) for 7 days. A sham operated but saline injected group served as control. On the 7th day, obstructed and non-obstructed kidneys were removed for the isolation of leukocytes by flow cytometry and for the assessment of histopathological and immunohistochemical changes.

RESULTS: The percentages of CD3⁺ T-lymphocytes, CD4⁺ T-lymphocytes, CD8⁺ T-lymphocytes and the ratio of CD3⁺/CD8⁺ T-lymphocytes infiltrating obstructed kidneys were increased in the SF, apelin and ala-apelin groups as compared to sham group. The percentages of CD4⁺ T-lymphocytes decreased in apelin group as compared to SF group. The ratio of CD3⁺/CD8⁺ lymphocytes infiltrating obstructed kidneys were decreased by both apelin and ala-apelin treatment. The scores of α-SMA expression was increased in SF group compared to sham-control group. However, the scores of α-SMA expression decreased in both apelin and ala-apelin treatment groups as compared to SF group. Interstitial fibrosis score determined by Masson-trichrome staining was increased in saline treated group compared to sham-control group. However, the fibrosis scores in the apelin and ala-apelin treated groups were higher than SF group.

CONCLUSION: The present data demonstrate that α-SMA expression was decreased in both apelin and ala-apelin groups. However, neither apelin nor blockade

of APJ receptor with ala-apelin prevented fibrosis in UUO. However, apelin by decreasing the infiltration of CD4⁺ T-lymphocytes may have a regulatory role in protecting against obstruction-induced tubular injury.

Keywords, unilateral ureteral obstruction, renal fibrosis, apelin, ala-apelin

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik böbrek yetmezliği ilerleyici bir tablo olup temel patofizyolojik mekanizma böbrek dokusunda izlenen inflamasyon ve bununla birlikte gelişen fibrozistir. Fibrozisin önlenmesi kronik böbrek yetmezliğine bağlı son dönem böbrek yetmezliği gelişimini, dolayısıyla da bir çok hastada diyaliz tedavisi ihtiyacını ortadan kaldırabilir. Tek taraflı üreter obstrüksiyon (UUO) modeli renal fibrozis mekanizmalarını ve olası tedavi ajanlarının etkinliğini araştırmada kullanılan modellerdendir.

Son yıllarda yapılan hayvan deneylerinde apelinin anti-apoptotik ve anti-inflammatuar etkilerinin olduğu, böbrek ve kalp dokusunda iskemi reperfüzyon hasarını önlediği rapor edilmiştir. Buna karşın karaciğer fibrozis modellerinde de apelin reseptör (APJ) antagonisti olan ala-apelin uygulamasının fibrozisi baskıladığı rapor edilmektedir.

Üreter obstrüksiyon modelinde direk olarak apelin sisteminin uyarılmasını yada baskılanmasının fibrozis gelişimi üzerine etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada UUO modelinde izlenen inflamasyon, apoptozis ve fibrozisi önlemede apelin ve apelin antagonisti ala-apelinin etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Böbrek Hastalığı ve Renal Fibrozis

Fibrozis, ilerleyici organ hastalığının karakteristik bulgusudur. Farklı etiyojileri olmasına rağmen renal hastalıklar, glomerüler skleroz ve interstisyel fibroze bağlı olarak son dönem böbrek yetmezliğine ilerler (1, 2). Ayrıca etiyojiden bağımsız olarak renal fibrozisin derecesi prognozu belirler (3, 4). Son dönem böbrek yetmezliğine sebep olan birçok hastalıkta interstisyel fibrozis uyarılır. Renal fibrozisin histolojisi tübüler atrofi ve dilatasyon, interstisyel lökosit infiltrasyonu, fibroblast birikimi ve artmış interstisyel matriks birikimi ile karakterizedir (5). Tübülointerstisyel fibrozisin ilerlemesi, interstisyel matriks artışı, tübüllerde baskı ve hasarlanmayla böbrek fonksiyonlarında bozulmayla sonuçlanır (6). Ayrıca interstisyel fibrozis tübül hücrelerinin beslenmesinde ve oksijenlenmesinde azalma ve tübüler hücrelerde epitelyal- mezenkimal tranzisyon (EMT) ve apoptoza yol açar (7). Renal fibrozis gelişiminde monosit- makrofajlar, miyofibroblastlar, EMT kaynaklı fibroblastlar rol oynar (8-11). Bu süreçte parankimi infiltre eden lökositler tarafından salgılanan inflamatuvar medyatörler inflamasyonu, tübül epitel hücre apoptozisini ve nekrozunu, matriks sentezini ve sonuçta da interstisyel fibrozisi uyarır. Glomerüler ve peritübüler kapiller yapı bozulur, gittikçe artan ekstraselüler matriks madde birikimi izlenir (5).

2.2. Üreter Obstrüksiyonu ve Kronik Böbrek Yetmezliği

Obstrüktif nefropati KBY etiyojisinin yaklaşık %2-4' ünü oluşturur. Üreter obstrüksiyonu üreterde idrar akımına direnç oluşturur. Obstrüksiyon kısmi veya tam; ünilateral veya bilateral olabilir. Etiyojisi değişken ve geniş kapsamlıdır. Üretral darlıklar ve benign prostat hipertrofisi tipik örnekleridir (Tablo 1).

Obstrüksiyonun süresi, derecesi ve seviyesine göre sınıflandırması yapılır. Obstrüksiyon, en sık olarak üreteropelvik bileşkede meydana gelir. Daha geniş bir terim olan "obstrüktif üropati", renal pelvis ve üretra arasında idrar akımında meydana gelen herhangi bir obstrüksiyonu göstermek için kullanılır.

Tek taraflı üreter obstrüksiyonu (UUO) insidansı, erişkinlerde 1-2/1000 olarak bildirilmektedir. Üreter taşı en sık nedenidir ve akut obstrüksiyon, tipik olarak,

majör semptom olan ileri derece renal kolik ile kendisini gösterir. Böbrek fonksiyonu ve etkilenen böbreğin anatomik bütünlüğünün korunması önemlidir.

Tablo 1. Üreter obstrüksiyonunun nedenleri

Retroperitoneal fibrozis/malignite
Lokal tümörlerin uzantıları
Vezikal tümör (üreter orifisini içeren tip)
Gebelik
İyatrojenik
Üreter darlığı (enfeksiyon/yaralanma sonrası)
Erişkinlerde ve çocuklarda üreteropelvik bileşke obstrüksiyonu
Taş
Çocuklarda konstipasyon

2.3. Böbrek Fibrozis Gelişimini İncelemede Üreter Obstrüksiyon Modeli

Tek taraflı üreter obstrüksiyon modelinde 7-14 gün gibi kısa bir sürede fibrozis belirgin olarak gelişir. Bu nedenle renal hastalıklarda fibrozis gelişim pataogenezini incelemeye UUO, oldukça pratik ve kolay uygulanabilir bir modeldir. Bu modelde ilk günden itibaren böbrek dokusuna lökosit infiltrasyonu başlar 3. günden itibaren belirgin bir hal alır. Bu dönemle birlikte fibroblast infiltrasyonu yada transformasyonu başlar ve 7. günde genelde belirgin fibrozis oluşur. Deney süresi 2. hafta sonuna kadar uzatıldığında fibrozis daha da belirgin hale gelir.

UUO modelinde üreter obstrüksiyonu ile başlangıçta nefron tübül segmentinde intralüminal basınç artar. Bu basınç 50-70 mmHg düzeylerine kadar özellikle ilk 3 saatlik dönemde yükselir. Bu sırada gerilimin indüklediği indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve endotelial NOS (eNOS) aktivitesinde artışa bağlı olarak sentezi artan NO aferent arteriolde dilatasyon yapar ve GFR artmış olur. Artan GFR glomerül filtratını artırdığından tübüllerde bir göllenme olur. Bu sırada antioksidan enzimlerin (örneğin katalaz) sentezi ve aktivasyonu baskılanır. Bu göllenmenin, intratübüler basınç artışının ve azalmış anti-oksidatif stres aktivitesinin yaptığı tübüler hasar sonucu nekroz ve apoptozis gelişir. Renal

kan akımı azalır. Stres altındaki tübül epitelyum hücreleri tarafından TGF- β 1, angiotensin-II (Ang II) gibi medyatörler salgılanır. Bu modelde üreter obstrüksiyonu ile oluşan mekanik güçler fibroblastları aktive eder. İnvitro şartlarda fibroblastlara gerilim uygulandığında α -SMA ekspresyonu artar, kollajen, laminin, fibronektin ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) üretmeye başlarlar (12, 13).

Fibroblastlar lokal interstisyel kökenli olabileceği gibi vasküler perisitlerden ve tübül epitel hücrelerden de köken alırlar. Iwano ve ark. yaptıkları çalışmada matriks üreten hücrelerin yaklaşık 1/3'ünün tübül epitel hücre kökenli olduğunu rapor etmişlerdir (8). Tübül epitel hücrelerinin fibroblastlara dönüşümünün (EMT) ilk evrelerinde epitel hücrelerini birbirine bağlayan E-cadherin ekspresyonu kaybolur (14). Ardından bu hücreler mezankimal hücre belirteçlerini eksprese etmeye başlarlar (15). Tübüler hasar inflamatuvar cevabı da tetikler. Hasarlı tübül epitel hücreleri interlökin-1 (IL-1) salgırlar. Bu inflamatuvar sitokinler tübül epitel hücrelerinde interselüler adhezyon molekül-1 (ICAM-1), vasküler selüler adhezyon molekül-1 (VCAM-1) gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırarak lökosit adhezyonunu kolaylaştırır. Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve monosit koloni uyarıcı faktörde (M-CSF), lökositlerin inflamasyon bölgesine göçünü kolaylaştırır. Makrofaj ve nötrofiller tarafından myeloperoksidaz salınımı gerçekleştirilir. Bu olaylar sonucu apoptozis ya da nekroz yoluyla tübül epitel hücre kaybı gerçekleşir.

2.4. UO Modelinde Fibrozis Gelişiminde Patogenetik Mekanizmalar

Birçok hayvan çalışmasında, UO sonrasında renal fibrozise yol açan mekanizmalar incelenmiş ve UO genel patofizyolojisi ile ilgili pek çok değerlendirme yazısı yazılmıştır (16-18). Bu modellerde fibrotik yanıt, tübüler bazal membranda kalınlaşma ve tübülöinterstisyel kompartmanda yaygın fiber birikimi ile karakterizedir. UO, direkt olarak tübülöinterstisyel fibrozise (TİF) neden olur. Üreterin tam obstrüksiyonu, hem sıçan hem de fare modellerinde hızla TİF'e yol açarken, tübülöinterstisyel lezyon 3. günde belirginleşerek 10-14 gün içinde gelişimini tamamlar (19-21). Bu durum, uzun süren şiddetli ya da tam obstrüksiyonla kendisini gösteren insan obstrüktif üropati olgularındaki böbreğin durumuna benzer. Hücresel strese yanıt olarak, renal hücrelerde inflamasyon gelişimi ve ölümü tübülöinterstisyel lezyon oluşumunda rol alır.

Stres altındaki hücreler, aynı zamanda, apoptozu indüklemek için otokrin ve parakrin yollarla etki eden mediyatörler üretirler. Fas-Fas ligand (FasL) etkileşimleri, Ang II ve TGF- β 1 aktivitesindeki artışlar, UUU sonrasında erken dönemde tübüler hücrelerde otonom apoptotik hücre ölümünden sorumlu tutulmaktadır (22-24). Obstrükte böbrekte Ang II üretiminde artış, TGF- β 1 indüksiyonu ve oksidatif stresteki artış aracılığıyla tübüler hücre ölümüne katkıda bulunur (25). İnsan obstrüktif üropati biyopsi örneklerinde TGF- β 1 aşırı ekspresyonu olması, bunun böbrek hasarının patofizyolojisinde rolü olduğunu teyit etmektedir (26).

Hasarlı tübüler hücreler, VCAM-1 ve ICAM-1 (27-29) gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonu aracılığıyla, renal mikrovasküler yapıların yapışkanlığında artışa sebep olan interlökin-1 (IL-1) (30, 31) gibi pro-inflamatuvar sitokinler salgırlar. Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) (32) ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) (33), aynı zamanda, tübüler hasar alanlarına inflamatuvar hücrelerin yönelmesini kolaylaştırır. Bu da, etkilenmiş böbrekte hücre ölümü sinyallerini artırır. İnflamatuvar yanıtın bir sonucu olarak meydana gelen hücre ölümünde, makrofajlar ve nötrofillerden, hipokloröz ve azot asitleri de dâhil toksik prooksidan maddelerin üretimini katalizleyen miyeloperoksidaz enzimi salınır (34). Ayrıca TNF- α ve Fas-L'de aynı zamanda bu hücre tiplerinden ve sonra T hücre popülasyonlarının ortaya çıkışından köken alabilirler (35).

2.4.1. UUU Sırasında Tübüler Epiteli Etkileyen Stres Faktörleri

Tübüler epitelin mekanik gerilmesi ve deskuamasyonu, obstrükte üreterde peristaltik retrograd basınç transferi ve üriner stazın bir sonucu olarak ortaya çıkan erken olaylardır (36). Nitrik oksit (NO) üretimindeki lokal artışı takiben renal perfüzyon ve filtrasyondaki erken artış sonucu intratübüler basınç yükselir. Direkt basıncın (130 mmHg) tübüler epitel hücre kültürleri üzerindeki etkilerini inceleyen bir in vitro modelde, basınç transferinin başlamasından sonraki 60 dakika içerisinde NO üretimi ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir (37). Hem iNOS ve hem de eNOS enzim aktivitesi, hasarlı tübüler epitel boyunca artış gösterir (37, 38). Nitrik oksit, doza bağımlı olarak afferent arteriollerini gevşetirken, glomerüler filtrasyon hızında artışa yol açarak idrarın göllenme etkisini artırır (39). Transfer edilen bu basınç, nefronları

saran epitel hücre örtüsünün düzleşmesine neden olur (21). Bu primer hasarın kesilmesi, üreteropelvik bölgedeki komplansta artışa ve obstrüksiyon sonrası ilk 24 saat boyunca göllenen idrarın lokal lenfatiklere şant yapmasına bağlıdır (40). Obstrüksiyonun sonraki dönemlerinde, renal kan akımı belirgin şekilde azalır, GFR azalır ve göllenen idrar hacminin daha da artması engellenir (36, 41). Sonuçta, obstrüksiyondan sonra 3. saatte meydana gelen maksimum tübül içi basınç (50–70 mmHg), obstrüksiyon sonrası normale yakın bir değere (30 mmHg) döner.

Tübüler kompartmandaki bu ilk stres uyarılarının hücre hasarı ve ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Etkilenen hücreler, inflamatuvar yanıtın üretilmesi için uyarı oluştururlar.

UUO sırasındaki tübüler hücre ölümünün, esas olarak, programlanmış hücre ölümü (apoptozis) yoluyla meydana geldiği gösterilmiştir. Apoptozun majör efektörleri olan kaspazlar, sistein aspartata spesifik proteazlardır. Bu enzimler, proteolitik olarak, hücre dışı ve hücre içi sinyallerle aktive edilen enzimlerdir. Aktif enzimle, genomik DNA parçalanır ve hücreler düzenli bir şekilde ölür. In vitro çalışmalar, mekanik gerilmeye tepki olarak oluşan tübüler hücre ölümünün oksidatif stresteki artışla ilişkili olarak kaspaz-bağımlı apoptoz aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir (42, 43). 24 saat süreyle proksimal tübüler epitel hücrelerinin mekanik gerilimi, gerilimin olmadığı kontrol kültürleri ile karşılaştırıldığında, endojen antioksidan katalaz mRNA ekspresyonu downregüle olmuştur (42). Hücresel katalaz aktivitesinin tükenmesi, mantıksal olarak, hidrojen peroksit detoksifikasyonunda azalmaya yol açar. Hasarlanmış alveoler epitel hücrelerinin kullanıldığı bir in vitro yara iyileşmesi modelinde, hidrojen peroksitin kaspaz-bağımlı apoptoz aracılığıyla hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (44).

Renal kan akımında azalma, böbrekte hipoksik bir ortam yaratarak tübüler hücre stresi ve ölümüne katkıda bulunur. Primer ve immortalize tübüler epitel hücrelerinin ölümü, in vitro hipoksi modellerindeki apoptoz aracılığıyla başlar (45, 46).

2.4.2. Tübüler Bazal Membran Degredasyonu

Tübüler epitel hücreleri EMT gelişimi sırasında birbirleri ile ve bazal membranla olan bağlarının kopmasından sonra interstisyel alana göç ederler. Tübüler bazal membran bütünlüğünün korunması, obstrüktif yaralanma sonrasında tübüler EMT'yi önlediği ve böbreği fibrotik lezyonlardan koruduğu gözlemi, EMT'de bazal membran yıkımının önemini göstermektedir (47). Tübüler bazal membran yıkımının, matriks metaloproteinazlar (MMP) olarak bilinen çinko-bağımlı endopeptidazlar tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir. UUO sonrasında obstrükte böbrekte MMP-2 ve MMP-9 ekspresyon ve aktivitesinin azaldığı, ancak sham-opere hayvanların böbrekleriyle kıyaslandığında metalloproteinaz-1 doku inhibitörü ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı bulunmuştur (48). Ancak, diğer yazarlar, MMP-2 ve MMP-7 aktivitelerinin UUO'dan kısa bir süre sonra arttığı ve daha sonra normale döndüğünü bildirmiştir (49, 50). Bu bulgular, EMT'nin meydana gelmesi sırasında, epitel hücrelerini çevreleyen bazal membran ve ekstraselüler matriksin (ESM) UUO'un erken dönemlerinde artış gösteren MMP aktivitesi sayesinde yıkıma uğradığını göstermektedir. Uzun vadede, interstisyel boşluktaki MMP aktivitesi inhibe edilir ve ESM birikimi artar.

2.4.3. UUO Modelinde Fibrozise Yol Açan Hücreler ve Medyatörler

2.4.3.1. Fibroblastlar, Myofibroblastlar ve EMT

Alfa-düz kas aktin (α -SMA) gibi miyosit belirteçlerini eksprese eden fibroblast görünümüne sahip hücreler, ureter obstrüksiyonu sırasında interstisyel fibrozis oluşumu açısından önemli bir role sahiptir (51). Böbrekteki interstisyel hücreler; fibroblastlar, dendritik hücreler ve lenfosit-benzeri hücreleri içeren heterojen bir popülasyondur. İnterstisyel fibroblastların uzun süreli aktivasyonu, masif proliferasyon ve aşırı ESM birikimi ile sonuçlanır. İnterstisyel miyofibroblastların sayısı, tübülointerstisyel fibrozisin şiddeti ve böbrek yetmezliğinin ilerlemesi ile yakından ilişkilidir (52).

Renal fibroziste rol alan aktif fibroblastlar ve miyofibroblastlar, çeşitli kaynaklardan köken alırlar (51, 53). Yerleşik interstisyel fibroblastlar UUO sırasında fibrozise katkı yapar (54). Ayrıca, vasküler perisitler miyofibroblastlara farklılaşarak fibrozise katkıda bulunur (55). Endotelial hücreler, endotelial-

mezenkimal geçiş aracıılığıyla miyofibroblastlara dönüşebilir (56). Yine UUU'da obstrükte böbrekte bulunan miyofibroblastların, epitelyal mezankimal dönüşüm (EMT) yoluyla tübüler hücrelerin dönüşümünden kaynaklandığı bildirilmektedir (51, 57). Renal tübüler progenitör hücreler de UUU sonrasında EMT'ye katkıda bulunur. Bu hücreler, üreter obstrüksiyonundan 3 gün sonra tübüler epitel hücreler arasında dağılır ve obstrükte böbrek interstisyumunda gözlenirken, kontralateral böbreğin interstisyumunda hiçbirine rastlanmamıştır (58). UUU sonrası kollajen sentezinde katkısı az görünse de, bazı miyofibroblastlar kemik iliğinden elde edilmektedir (59). EMT türevli miyofibroblastların UUU sonrası 7 güne kadar ortaya çıkmadığı düşünülürken, yerleşik fibroblastlar ve perivasküler perisitler UUU sonrası ilk saatlerde aktif fibroblast miyofibroblast majör kaynakları olabilir (55).

Pek çok in vivo çalışmada EMT'nin UUU modelinde meydana geldiği gösterilmiştir. Ancak en kesin kanıtlar, Iwano ve arkadaşlarının yaptığı önemli çalışmadan elde edilmiştir (8). Genetik olarak etiketli proksimal tübül epitel hücreleri kullanarak, tübülointerstisyel boşluktaki matriks üreten hücrelerin %36'sının tbloepitelyal kökenli olduğunu göstermiştir (8).

EMT, epitelyal bileşkelerin yıkımı ve hücre polarite kaybı ile karakterizedir (60). Kboidal hücre fibroblastoid şekle değişir, E-kaderin, zonula okldens ve sitokeratin gibi epitelyal protein belirteçleri azalır ve Vimentin, α -SMA ve fibroblast özgün protein-1 (FSP-1) gibi mezenkimal belirteçler artar (51). Son olarak hücreler, bazal membranı parçalama ve tübüler boşluktan, miyofibroblast morfolojilerinin gelişeceği yer olan interstisyel boşluğa g etme kapasitesi kazanırlar.

Hipoksi ve mekanik gerilme gibi UUU ile ilgili uyarıların da kültüre edilen hücrelerde bu geçişe neden olduğu gösterilmiştir. Hipoksi, kültüre edilen hücrelerde TGF- β 1 indüksiyonuna neden olurken (61-63), TGF- β 1'in direkt olarak kültüre tübüler epitel hücrelerinde EMT indüksiyonuna neden olduğu bilinmektedir (64).

2.4.3.2. Lokal İnterstisyel Fibroblastların Aktivasyonu

Fibroblast zgn protein 1 (FSP-1), ekto-5'-nükleotidaz, vimentin ve α -SMA, aktif fibroblast belirteçleridir. Sağlıklı bir böbrekte, kortikal interstisyel fibroblastlar ancak

ekto-5'-nükleotidaz ekspresyonu ile tespit edilirken bu hücrelerde α -SMA ko-ekspresyonu gözlenmemiştir (65) . UUO'nun 1 gün sonrasında, interstisyumda hem ekto-5'-nükleotidaz hem de α -SMA eksprese eden hücreler görülmüştür ve bu hücreler UUO sonrası 4. güne kadar sayıca artış göstermiştir. Ekto-5'-nükleotidaz ve α -SMA'nın eş zamanlı ekspresyonu, UUO sonrası en az dördüncü güne kadar, buradaki yerleşik fibroblastların aktif fibroblastların kaynağı olabileceğini gösterir.

Fibroblastların mekanik gerilme ile aktivasyonu mekanik ve kimyasal faktörler tarafından regüle edilmektedir. Mekanik gerilme, kültür ortamında fibroblastlarda α -SMA ekspresyonunu indükler ve bu gerilimin ortadan kaldırılması ile α -SMA ekspresyonunu azalır (12). İn vitro ortamda siklik gerilmeye maruz kalan renal fibroblastlar kollajen, laminin, fibronektin ve TGF- β üretir (13).

2.4.3.3. Monositler ve Makrofajlar

UUO modelinde inflamatuvar ortamın oluşması ile ortamda nötrofil, monosit-makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu izlenir. Farelerde differi toksininin ekspresyonu ile CD11b⁺ hücrelerin ortadan kaldırıldığı UUO modelinde monosit ve makrofajların rolü incelenmiştir (55, 66). Makrofajlardan salınan bir molekül olan galektin-3 defektif farelerde UUO sonrası fibrozis gelişiminin önlendiği rapor edilmiştir (66, 67). UUO modelinde infiltre eden monositler M2 fenotipinde olup PDGF-B, galectin-3, IGF-1, ve CCL22 gibi profibrotik faktörler salgırlar (68).

2.4.3.4 Dendritik Hücreler ve Lenfatik Sistem

Dendritik hücreler tarafından immün sistemin aktivasyonu akut ve kronik inflamasyonun başlamasında, sonraki aşamada da fibrozis gelişiminde önemli rol oynar. Nefrektomi ile oluşturulan KBY modelinde tübül epitel hücrelerinden alınan albümin, interstisyumda bulunan dendritik hücreler tarafından lenf nodlarındaki CD8⁺ T hücrelerine sunulmaktadır (69). Ovalbümin ile sensitize edilmiş CD8⁺ T hücreleri ve aktive CD4⁺ T hücreleri farelere enjekte edildiğinde ise podositlerinde ovalbümin eksprese edilen farelerde periglomerüler infiltrasyon gelişmiştir. Bu T hücreleri tekrar tekrar enjekte edildiğinde fibrozis artarak devam etmiştir. (70)

Lenfanjiogenezi tetikleyen VEGF-C proksimal tübül epitel hücrelerinde ve makrofajlarda bulunmuştur (71). Lenfanjiogenez ise inflamatuvar infiltratı

kolaylaştırır (72, 73). Tübülointerstisyel fibrozisle birlikte lenfanjiogenez artarken, (71, 74) peritübüler kapiller sayısı azalır.

2.4.3.5. Mast Hücreleri

Mast hücreleri kazanılmış bağışıklıkta (innate immünitete) ve kronik inflamasyonda rol alırlar. Normal sağlıklı bir böbrekte mast hücrelerine nadiren rastlanılırken fibrotik böbreklerde böbrek fonksiyonları ile ters orantılı olarak sayıları artmıştır (75-77). Buna karşın mast hücrelerinin olmadığı bir fare UO modelinde fibrozis gelişimi baskılanmıştır (78).

2.4.3.6. Lenfositler

UO modelinde salgılanan sitokinler lokal olarak lökosit infiltrasyonuna neden olurlar (79). Örneğin T-lenfositler ve makrofajlar üzerinde eksprese edilen kemokin reseptör-1 (CCR1) taşımayan farelere UO modeli uygulandığında interstisyumu infiltre eden makrofaj sayısı %35 oranında, lenfosit sayısı da %55 oranında azalma göstermiş ve fibrozis gelişimi de önlenmiştir (80).

Lökositlerin UO modelinde fibrozis üzerine etkileri ilk önce T ve B lenfositleri bulundurmayan ağır birleşik immün yetmezliği (severe combined immunodeficiency, SCID) bulduran farelerde çalışılmış ve bu farelerde fibrozis geliştiği gösterilmiştir (81). Niedermeier ve ark. da yaptıkları çalışmada UO yapılan SCID farelerde fibrosit sayısının azaldığını ve kollajen-1 depolanmasının azaldığını göstermişlerdir. Yine bu çalışmada bu kez normal farelere anti-CD4 antikoru verilerek CD4⁺ hücreleri yok edildiği (deplete) edildiği zaman obstrüksiyon yapılan böbrekte fibrosit sayısının azaldığını ve kollajen-1 depolanmasının azaldığını göstermişlerdir (82). Bu bulgular lenfositlerin ve özellikle CD4⁺ T lenfositlerinin UO modelinde gerçekleşen fibroziste rol oynadığını göstermektedir. Tapmeier ve ark. ise RAG taşımayan farelerde (bu fareler recombinase activating gene-1 taşımadıklarından lenfosit ihtiva etmezler) fibrozis belirgin olarak az izlenirken, UO oluşturulmadan hemen önce bu farelere normal farelerden alınan CD4⁺ T lenfositleri infüze edildiği zaman fibrozis artmıştır. CD8 infüzyonu ile fibrozis izlenmemiştir (83).

2.4.3.7. Sitokinler

TGF- β gibi sitokinler, platelet kökenli büyüme faktörü (84), fibroblast büyüme faktörü (85) fibronektin varyantları, fibroblast aktivasyonu ve proliferasyonunda rol alırlar (86). İnfiltrate olan lökositler tarafından salgılanan kemokinlerde, fibroblast aktivasyonunun regülasyonuna katılır (87). TGF- β , Smad2 ve Smad3 yolları ile α -SMA ekspresyonu aracılığıyla direkt fibroblast aktivasyonuna neden olan majör bir büyüme faktörüdür. UUO, özellikle şiddetli TIF olan alanlarda, belirgin Smad2 ve Smad3 aktivasyonuna neden olur (88).

Demirbilek ve ark. üreter obstrüksiyonundan 10 gün sonra böbrek dokusunda TGF- β 1 ve IL-1 α , IL-6, ve TNF- α sitokinlerinin arttığını göstermişlerdir. Yine böbrek dokularında NF- κ β ekspresyonu da artmıştır (89).

Yine böbrek dokusuna lökosit infiltrasyonunda rol alan bir molekül de ICAM-1'dir (90). Cheng ve ark. UUO modelinde ICAM-1 antisense oligonükleotidlerinin kullanılması ile inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve ekstraselüler matriks birikimi azalmıştır (91). Tübüler epitel hücrelerinde ICAM-1 ekspresyonunu özellikle IL-1, TNF- α , ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinler indüklemektedir (92) Farelerde UUO sonrası 3. günden itibaren ICAM-1 ekspresyonunu göstermeyen böbrek dokusunda, ICAM-1 ekspresyonu artmaktadır. UUO uygulanan böbrekte ICAM-1 ekspresyonunda artışla birlikte IL-1 β ,ve IL-1R ekspresyonu da artmaktadır. Yine bu çalışmada farelere genetiği oynanmış kemik iliği kökenli ve adeno viruslar aracılığı ile IL-1ra ekspresyonu arttırılmış CD11b⁺CD18⁺ hücreler enjekte edildiğinde ICAM-1 pozitif interstisyumda (obstrüksiyon uygulanan) CD11b⁺IL-1ra⁺ taşıyıcı hücreler artarken ICAM-1 negatif böbrekte (obstrüksiyon uygulanmayan) CD11b⁺IL-1ra⁺ hücre izlenmemiştir. Farelere CD11b⁺IL-1ra⁺ hücrelere enjekte edildiğinde obstrükte böbrek varlığında makrofaj infiltrasyonu, ICAM-1 ekspresyonu ve α -SMA ekspresyonu IL-1ra ekspresyonunu göstermeyen CD11b⁺ hücre enjeksiyonu yapılan farelerin obstrükte böbreklerine kıyasla belirgin olarak azalmıştır. Bu bulgular IL-1'in de interstisyel fibrozis gelişiminde rol oynadığını göstermektedir (30).

2.4.4. UUO'da Apoptozis ve Fibrozisle İlişkisi

Obstrükte böbrekteki pek çok sitokin artışı tübüler hücre apoptozu ile ilişkilidir. UUO'da apoptozise öncülük etme rolüne ek olarak, TGF- β 1'in renal hasardaki en önemli profibrotik sitokinlerden birini temsil ettiği belgelenmiştir (19, 93, 94). Temel

fibroblast büyüme faktörü (bFGF), hem TGF- β 1'i indükleyen hem de TGF- β 1 tarafından indüklenen ve UUO sonrasında fibroziste büyük öneme sahip olduğu gösterilen diğer bir profibrotik sitokindir (85, 95, 96).

UUO sonrasında TGF- β 1'in iki ana kaynağı hasarlı tübülde meydana gelen erken otokrin olaylar ve UUO sonrası meydana gelen inflamasyondur. TGF- β 1'in, in vivo ve in vitro modellerde renal hasarı takiben apoptozu teşvik ettiği bilinmektedir (37, 97). Renal hücrelerde, Ang II'nin pro-apoptotik etkilerine kısmen TGF- β 1'in indüksiyonu aracılık eder (25). TGF- β 1'in direkt olarak renal tübüler hücre apoptozunu indüklediği, bunun yerine diğer ölüm sinyallerine yanıt olarak apoptozisin öncülüğünü yaptığı kanıtlanmıştır. TGF- β 1, pro-kaspaz-9'un kaspaz 9'a dönüşümünü hızlandırırken, bunu kaspaz 3'ün aktivasyonu takip etmiştir.

TGF- β 1'in en mükemmel profibrotik mediyatör olduğu kabul edilmektedir. Epitelyal hücreler, mesanjijal hücreler ve fibroblastlarda kendi reseptörleriyle etkileşip, hücre dışı matris proteinlerinde (örneğin kollajen I, III ve IV ve fibronektin) artışa neden olabilmektedir (98, 99). Bu durum, hem doğrudan hem de dolaylı olarak, bağ dokusu büyüme faktörünün (CTGF) indüksiyonu ile ortaya çıkabilir (100). Buna ek olarak, TGF- β 1, epitel hücreleri ve fibroblastlardaki çeşitli matriks metalloproteinazların (MMP) (101, 102) yanı sıra, endojen inhibitörlerinin bazılarının da [örn, metalloproteinaz-1'in doku inhibitörü (TIMP-1)] ekspresyonunu upregüle eder (103). TGF-1 aynı zamanda, matriksle etkileşen integrin moleküllerinin upregülasyonunu ve alt birimlerini indükler (104, 105). Böylece, lif miktarı, hücre motilitesi ve invazivliği artar. Bu da, kompartmana spesifik, patolojik matriks remodelingi ve skarlaşmaya yol açmaktadır. TGF- β 1, kendi reseptör kompleksinin stimülasyonu ve esas olarak Smad yolağı olmak üzere çeşitli hücre içi yolakların downstream (aşağı akış) mobilizasyonu yoluyla bu etkileri gösterir (106, 107).

Sıçanlarda UUO'dan 1 gün önce ve UUO sonrası 13 gün boyunca 2 gün aralıklarla TGF- β 1-nötralizan antikor verilmesinin TİF şiddetini azalttığı görülmüştür (24). Bu deneyin ilk aşamasında, nötralizan antikor, tübüler repliferasyon hızındaki rastlantısal bir artış ile beraber tübüler apoptozu büyük ölçüde azaltmıştır. Apoptozdaki azalma, tedavi uygulanmayan kontrollerle karşılaştırıldığında mitokondriyal Bcl-2 lokalizasyonunun korunması ve p53 ekspresyonunun azalması ile ilişkilendirilmiştir. Aynı çalışmada, mekanik gerilme,

NRK-52E hücrelerinde anlamlı bir şekilde apoptozu indüklemiştir. Ancak bu yanıt, TGF- β 1-nötralizan antikör varlığında tamamen inhibe edilmiştir. Bu çalışmada, TGF- β 1 direkt profibrotik rolünün inhibisyonunun da meydana gelmesi muhtemeldir. Nötralizan antikörün hem antiapoptotik hem de direkt antifibrotik etkisinin TİF gelişimini önlemek için sinerjik bir şekilde çalışması muhtemeldir.

TNF- α , UÜO'yu takiben tübüler hücre ölümünde rol oynadığı düşünülen diğer bir sitokindir. Çözünebilir tip-1 TNF- α reseptörünün pegile formu uygulanarak TNF- α biyolojik aktivitesinin engellenmesi, obstrüksiyonla indüklenen kaspaz aktivitesi ve tübüler hücre apoptozunu anlamlı olarak azaltmıştır (108). İlginç bir şekilde, tip-1 TNF- α reseptörü nakavt edilmiş farelerde, UÜO'yu takiben tübülointerstisyel fibroziste azalma görülmüş. Bu durum TNF- α aktivitesi aracılığıyla apoptoz ve fibrozis arasında bir bağlantı olabileceğini göstermektedir (109).

Renal Ang II üretimi, obstrükte böbrekte artmakla beraber, in vitro çalışmalar, patofizyolojik olarak eşdeğer dozlarda uygulandığı zaman tübüler epitel hücre kültürlerinde apoptozis indüklediğini göstermiştir (25). UÜO hayvan modellerinde, ACE inhibitörleri ve ANG II tip 1 reseptör delesyonunun erken apoptoz ve geç dönem fibrozda bir azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur (20, 23).

Tam tersine, bazı faktörlerin artmasıyla tübüler apoptozdaki azalma sonrasında UÜO ilgili fibrozun gelişimini artırdığı gösterilmiştir. TGF- β 1 nötralizan antikora benzer bir etki, hepatosit büyüme faktörü (HGF) transgen bazlı tedavi uygulanan sıçanlarda gözlenmiştir (110). Bu sıçanlarda, hücre çoğalmasında bir artış ve tam UÜO'yu takiben tübüler apoptozda inhibisyon olmuştur. TGF- β 1-nötralizan antikorda olduğu gibi, HGF-transfekte UÜO olan sıçanlarda mitokondrideki Bcl-2 ekspresyonu korunmuştur. HGF'ün TGF- β 1 sinyallemesini antagonize ettiği gösterilmiş olup bu HGF ekspresyonu ve TGF- β 1 nötralizasyonu ile elde edilen benzer sonuçları açıklayabilir.

İnsülin-benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1), UÜO ile indüklenen renal hasarı iyileştirdiği gösterilmiştir. IGF-1 tedavisi, tübüler apoptozu %38, renal interstisyel kollajen içeriğini %44 oranında azaltmıştır .

BMP-7, akut böbrek hasarı ve diyabetik nefropatide downregüle olan, nefrogenezisde tübüler gelişim ve olgun renal tübül epitel hücrelerinde

diferansiyasyon sağlayan bir büyüme faktörüdür (111, 112). BMP-7 aktivitesinin TGF- β 1bağımlı bir mekanizma yoluyla renal hücrelerde inhibe edildiğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır; TGF- β 1 uygulanan tübüler epitel hücrelerinde BMP-7 ve Alk3 ekspresyonunun azaldığı ve endojen bir BMP-7 antagonisti olan gremlinin ekspresyonu artmaktadır (112). Aynı çalışmada, yalnız başına BMP-7 ekspresyonu kaybının, profibrotik gen ekspresyonunu artırdığı belirtilmiştir. UUU sırasında ve daha sonraki her gün BMP-7 uygulanması, tübüler apoptoz hızındaki artışı engellemiştir (113). Ayrıca tübüler dejenerasyon, atrofi tübülointerstisyel inflamasyon ve fibrozis progresyonu inhibe edilmiştir. BMP-7, nefrotoksik serum nefriti modelinde EMT, TİF ve böbrek fonksiyon bozukluğunu tersine çevirmiştir (10, 109). 3 günlük UUU giderildikten sonra BMP 7 verilmesi, UUU'ndan 7 gün sonra fibrozisi azalttığı ve GFR ve renal kan akımını koruduğu görülmüştür (114).

EGF ve reseptörünün (EGF-R) uyarılmasının, UUU hayvan modellerinde, apoptoz derecesine ve fibroz oluşumuna karşı koruyucu olduğu ortaya konmuştur. EGF'nin genellikle Akt yolağının aktivasyonu ile proliferasyonun artmasına ve apoptoze olan duyarlılığın azalmasına yol açtığı belirtilmektedir (115). UUU sonrasında, renal tübüllerde, EGF, mRNA ekspresyonu ve protein seviyelerinde bir azalma olduğu gösterilmiştir (116). UUU sonrasında, erişkin Sprague-Dawley sıçanlarına rekombinan EGF uygulanması, 3. günde DNA merdiveni ve apoptotik gövde oluşumu dahil olmak üzere, apoptoz belirteçlerinde bir azalmaya yol açar (117). Chevalier ve ark. alışmasında EGF, tübüler proliferasyonu %76 artırırken, tübüler apoptozu da %80 azaltmıştır. Bu durum, tübüler atrofi ve dilatasyonla, TGF- β 1 düzeylerinde azalma ve kantitatif TIF ölçümündeki %50'lik azalma ile ilişkili bulunmuştur (118). Obstrüksiyon giderildikten sonra EGF tedavisi, serum fizyolojik uygulanan sıçanlarla kıyaslandığında, vimentin ve clusterin ve tübüler hasar belirteçlerinde azalma ve tübüler atrofide % 50 azalmayla ilişkilidir (16).

Osteopontin, UUU sırasında sıçanların renal tübüler hücrelerinde ve in vitro ortamda sıçanların tübüler epitel hücre hattında Ang II ya da kombine TGF- β 1 ve EGF ile stimölasyon sonrasında upregüle edilen bir glikoproteindir (119-121). UUU sonrasında, osteopontin bulunmayan farelerde tübüler apoptoz oranında artışın yanı sıra, makrofaj akını, TGF- β 1 ekspresyonu ve aktivitesi ve kollajen I ve IV'ün interstisyel depolanmasında azalma olduğu görülmüştür (122). Bu durum,

farelerde, bazı antiapoptotik sinyaller ve fibrozis gelişimi arasında ters bir ilişki olabileceğini göstermektedir.

2.4.5. UÜO Sonrası Oksidatif Stres ve Fibrozis

Tübüler epitel hücre kültürlerindeki mekanik gerilmenin oksidatif stres ve apoptoza neden olduğu bilinmektedir.

Oksidatif stres reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretimindeki artıştan, anti*oksidan sistemin bozulmasından veya her ikisinden birden kaynaklanır. Sonuçta süperoksid anyonu oluşur. Bu anyon daha sonra süperoksid dismutaz enzimi aracılığı ile hidrojen peroksida (H_2O_2) dönüştürülür. ROS'un kaynağı; ksantin oksidaz, NADPH oksidaz ve siklooksijenaz gibi enzimlerin aktive olmasıdır.

Oksidatif stresin derecesi ve daha sonra gelişen renal fibrozisin derecesi üretilen ROS derecesi ile anti-oksidan sistemin arasındaki dengesizlik önemli rol oynar. Kawada ve ark. UÜO modelinde obstrükte böbreklerde oksidatif stresin arttığını rapor etmiştir (123). İki anti-oksidan enzim, katalaz ve glutatyon peroksidaz H_2O_2 'yi su ve oksijene parçalar. Bu reaksiyonlarda görev alan ilk enzim glutatyon peroksidaz iken ikincisi de katalazdır. Bu sistemlerden katalaz sistemi düşük afiniteli ancak yüksek kapasiteli bir sistem olup UÜO modelinde fibrozis üzerine etkileri katalaz bulundurmeyen farelerde incelenmiştir. Kontrol farelerine kıyasla katalaz enzimi bulundurmeyen farelerde hasar daha fazla olmuştur. Lipid peroksidasyon ürünlerinden 4-hidroksi-2-hekzenal, malondialdehid ve 4-hidroksi-2-nonenal katalaz enzimi bulundurmeyen farelerin tübüler epitel hücrelerinde 4. günden itibaren anlamlı olarak artmıştır. Yine bu farelerin dilate tübüllerinde bir apoptosis indükleyicisi olarak kaspaz-9 aktivitesi de artmıştır. Yedinci günden itibaren ise glutatyon peroksidaz aktivitesi artmıştır (124). Yine bir başka çalışmada UÜO modelinde katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir (42).

Proapoptotik faktörlerin mitokondriden ilk salınımının hücre içinde prooksidan ortamın oluşmasına bağlı olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Bu nedenle, antioksidanlar, potansiyel olarak stres altındaki tübüler hücrelerde apoptoz inhibitörleri olarak etki edebilir. Katalaz taşımayan farelerde artan ROS'lerin tübül epitel hücrelerini apoptoze daha sensitize ettiği gösterilmiştir (124). Yine fluvastatin ve α -tokoferol gibi diğer pek çok stratejinin oksidatif stresi azalttığı

ve UUO sonrasında tübülointerstisyel fibrozisi gelişimini önlediği gösterilmiştir (125-127). Yine katalaz taşımayan farelerde telmisartanla yapılan bir başka çalışmada ise NADPH ekspresyonunun baskılanması sonucu ROS ve lipid peroksidasyon ürünleri, apoptozis ve kollajen tip-1 ve tip4 ekspresyonu baskılanmıştır (128). Bu bulgular oksidatif stresin baskılanmasının UUO modelinde fibrozis gelişimini önlemede etkin olacağını göstermektedir.

2.5. Apelin: Yapısı ve Fonksiyonları

O'Dowd ve arkadaşları 1993 yılında özgün bir orphan G protein çiftli (G protein coupled) bir reseptör olarak APJ reseptörünü tanımlamışlardır (129). Tatemoto ve ark. ise 1998 yılında sığır midesinden APJ reseptörüne bağlanan 36 amino asit büyüklüğündeki peptidi ilk kez tanımlamışlar ve apelin-36 olarak adlandırmışlardır (130).

Insan X kromozomunun uzun kolunda bulunan apelin geni, daha kısa aktif peptitlere ayrılacak olan 77 amino asitlik bir preproteini kodlar (130-132). Tam uzunluktaki matür peptitler, 36 amino asitten (apelin-36) oluşur ve ilk olarak sığır hayvan midesi ekstresinden izole edilmiştir. Sığır kolostrumun jel filtrasyon kromatografisi apelin-36 ile birlikte, 13 amino asitli bir peptide (apelin-13) karşılık gelen ikinci bir aktivite zirvesi göstermiştir . 13 amino asitli peptidin N-terminalinde ki piroglütamat değişimi, peptidi enzimatik bölünmeye dirençli hale getirir. Biyolojik olarak 12 amino asitten kısa parçalar etkisizdir. Apelin-36'nın apelin-19, apelin-17, apelin-16 ve apelin-12 içeren sentetik C-terminal fragmanları APJ reseptörünü aktive eder (130, 132-137). Kısa apelin izoformları daha büyük bağlanma afinitesi ve biyolojik etki gösterir. En etkili form, aktif biyolojik ligandı temsil edebilen piroglutamatlanmış apelin-13 formudur (132, 134, 135). Apelin gen ekspresyonu, hipoksi ile indüklenen faktör-1 regülasyonu altında hipoksiye yanıt olarak artar (138). ACE-2, hem apelin-13 hem de apelin-36'yı hidrolize eder ve bilinen tek parçalanma yolağıdır (139).

APJ reseptörü AT1 reseptörü ile yakın benzerlikler göstermesine rağmen anjiyotensin-II bağlamamaktadır (130) . Bu reseptör, 380 amino asit uzunluğunda olup, yedi transmembran domaininden oluşur ve aynı zamanda hücreye özgü olabilecek bir özellik olan agonistden bağımsız nükleer bir lokalizasyona izin veren

bir sinyal dizisi içerir (140). GPKR'ler, klinik olarak kullanılan tüm mevcut ilaçların neredeyse yarısının hedefidir (141) ve sinyal iletim mekanizmasının önemli bir bileşenidir (142). Apelinin APJ'ye bağlanması, G proteinleri ile eşleşme sonrasında ikinci mesajcı sinyalleme kaskadını aktive ederken, bu durum, mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler) ve çoklu biyolojik cevapları teşvik etmekle sorumlu olan PI3K/AKT yolağı gibi santral sinyalleme moleküllerinin aktivasyonu ile sonuçlanır (136, 143, 144).

Apelin eksprese eden hücreler üzerinde yapılan deneylerle apelin-36'nın fragmanı olan apelin-13 ve apelin-17'nin, apelin-36 dan sırasıyla 54 ve 8 kez daha kuvvetli olduklarını göstermişlerdir (130). APJ bağlayan bölgeler ve/veya APJ kodlayan mRNA akciğer, kalp, arter, ven, iskelet kası, böbrek, beyin, karaciğer ve over gibi birçok insan ve sıçan dokusunda gösterilmiştir (131, 134, 145, 146). Bundan başka apelin mRNA'sı veya immünoreaktif apelin mide, beyin, kan damarları, akciğer, testis, uterus, meme dokusunda tespit edilmiştir (130, 131, 134, 145-147). Yine Klein ve ark. çalışmasında insanlardan elde edilen taze dokularda apelin benzeri immuno reaktiviteyi kalp, böbrek, akciğer ve adrenal bez damar endotel hücrelerinde göstermişlerdir (148).

Hus-Citharel ve ark. sıçanlarda yaptıkları deneyde apelin reseptörünün böbrek dokusunda dağılımını incelemişlerdir (149). Apelin mRNA'sının medullanın en fazla iç katmanında daha sonra da sırasıyla dış katman, iç medulla ve kortekse doğru gitikçe azalarak eksprese olduğunu göstermişlerdir. Nefron segmenti boyunca ise en yoğun apelin mRNA düzeyleri glomerülde tespit edilmiştir. Aynı çalışmada apelinin fonksiyonel etkilerini böbrek damarlarında incelediklerinde ise, anjiyotensin II ile jukstamedüller glomerüler afferent arteriyollerde oluşturulan konstriksiyonun apelin ile gerilediğini göstermişlerdir. Apelin bu etkisini anjiyotensine bağlı olarak artan intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonlarını süratle düşürerek yapmıştır. Apelinin bu etkileri L-NAME kullanılmasıyla ortadan kalkmıştır. Endoteli çıkartılmış afferent arteriyoller kullanıldığında ise apelin bu etkilerini gösterememiştir. Bu nedenle apelinin reseptörlerinin endotele lokalize olduğu sonucuna varılmıştır. Tek başına apelin sağlam afferent ve efferent arteriyollere uygulandığında, Ca^{+2} konsantrasyonları anlamlı olarak artmıştır. Bu artış afferent arteriyollerde, efferent arteriyollerden daha fazla olmuştur (149). Hem apelin hem de apelin mRNA ekspresyonu, beyinde yaygın bir dağılım

göstermektedir. Bu peptidler, özellikle de magnoselüler nöronların bir alt kümesinde vazopressin (AVP) ile birlikte lokalize oldukları yer olan supraoptik ve paraventriküler hipotalamik nükleuslarda, yüksek düzeyde eksprese edilmektedir (147, 150, 151). AVP sentezi ve salınımındaki artışlarla karakterize olan laktasyondaki sıçanlarda, apelinin santral enjeksiyonu, AVP nöronlarının fazik elektriksel aktivitesini inhibe eder, plazmadaki AVP düzeylerini düşürür ve aköz diürezisi artırır (152). Ayrıca, sistemik AVP salınımını artıran ve hipotalamik AVP deposunda azalmalara neden olan su kısıtlaması, plazmadaki apelin konsantrasyonunda azalmaya yol açmış ve hipotalamusta peptid toplanmasını indüklemiş olup, bu durum, AVP ve apelinin, sistemik AVP salınımını kolaylaştırmak üzere tam tersine regüle edildiğini ve böylece böbrek düzeyinde ilave su kaybını önlediğini göstermektedir. Birlikte ele alındığında, bu veriler, AVP'nin etkileri ile mücadele ederek vücut sıvı dengesinin korunmasında santral apelinin oynadığı önemli rolü vurgulamaktadır. Sıçan böbreğinde apelin reseptörü mRNA ekspresyonu (132, 146) bulunduğu için ve insan toplayıcı (153) kanallarında apelin immünoreaktivitesi tespit edildiği için, apelinin su diürezisi üzerindeki etkisi, sadece santral bir etkiyi kapsamayıp, aynı zamanda intrarenal reseptörlere bağlanma yoluyla periferik ve/veya intrarenal bir hemodinamik etkiyi kapsamaktadır.

Sıçanlara apelin 10, 20 ve 40 nmol/kg dozlarında ve 10-12 dakika aralıklarla uygulanmasının kan basıncını doza bağlı olarak düşürdüğü ve kalp hızını da arttırdığı gösterilmiştir. Gangliyon blokajı yapılan sıçanlarda ise apelinin yine doza bağlı olarak kan basıncını ve ortalama dolum basıncını kalp hızında değişiklik olmaksızın düşürmüştür (145). Bir başka çalışmada da spontan olarak hipertansif olan farelere yapılan apelin-13 ve apelin-12 (15 mcg/kg) enjeksiyonları ile, ortalama arteryel kan basıncında sırasıyla yaklaşık % 60 ve %15'lik sistolik ve diastolik kan basıncı düşürülmüştür. Apelin-13 (13[D-Phe]) tedavisi, etkinlik ve süre açısından apelin-12'den farklı bulunmamışken, ala-apelin-13 (F13A) fonksiyon kaybına yol açmıştır. Bununla birlikte, ala-apelin-13'ün (F13A) (30 mcg/kg) birlikte uygulanması, apelin-13 (15 mcg/kg)'ün hipotansif etkisini önlerken, bu durum ala-apelin-13 (F13A)'ün apeline-spesifik bir antagonist olarak davrandığını ortaya koymaktadır (136).

Apelinin nitrik oksit-arjinin sistemini aktive ederek vazodilatasyona sebep olduğunu gösteren yayınlar da bulunmaktadır. Anestezi almış sıçanlarda, apelin kan basıncını düşürürken, plazma nitrit/nitrat konsantrasyonları artmış ve apelinin bu etkisi bir nitrik oksit sentaz inhibitörü olan NG-nitro-L-arginin metil ester tarafından engellenmiştir (135). Apelinin izole kalpte inotropik etkisi olduğu da rapor edilmiştir (137). Apelin-12'nin ise apelin-13 ve apelin-36'dan daha kuvvetli bir kan basıncı düşürücü etkisinin olduğu gösterilmiştir (135). Apelin sıçanlarda kardiyak kontraktileti de G protein eşikli fosfolipaz C, protein kinaz-C ve sarkolemma Na^+-Ca^{2+} ve Na^+-H^+ transport sistemini aktive ederek arttırmaktadır (137). Bu bilgiler ışığında apelinin farklı doku ve organlarda ikincil mesaj sistemlerini aktive ettiğini görmekteyiz.

Bir başka çalışmada ise apelinin oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (154). Szokodi ve ark. ise basınç yüklenmesine bağlı kalp yetmezliği geliştiren farelerden elde edilen kardiyak fibroblastlar, kültür ortamında apelin ile inkübe edildiklerinde, TGF- β tarafından indüklenen α -SMA ve kollajen üretiminin inhibe olduğu görülmüştür. Yine bu çalışmanın in vivo kısmında farelere aort ligasyonu yapılmadan 2 hafta önce apelin uygulanması ile de myosit hipertrofisi, kardiyak fibrozis ve ventriküler disfonksiyon önlenmiştir (137, 155). Bir başka çalışmada da aort anevrizma modeli kullanılmış ve apelin infüzyonu ile inflamatuvar cevap baskılanmış ve anevrizma gelişimi önlenmiştir (156).

Diğer taraftan apelinin fibrozise sebep olabileceğini gösteren yayınlarda bulunmaktadır. Apelin-APJ reseptör kompleksinin anjiyogenez ve inflamasyonda önemli işlevlere sahip olduğunu gösteren yayınlarda bulunmaktadır. Sirotik insanlardan elde edilen hepatik stellat hücrelerde (HSH) apelin ekspresyonunun arttığı ve bu hücrelerin profibrojenik moleküllerden anjiyotensin II (All) ve endotelin-1 (ET-1) ile inkübe edilmeleri ile kollajen-I ve platelet-kökenli büyüme faktör reseptör- β (PDGF- β) sentezinin arttığı gözlenmiştir. Apelin reseptörü, apelin antagonisti F13A ile bloke edildiğinde ise bu artışlar baskılanmıştır. Yine bu çalışmada fibrotik sıçanlara All veya ET-1 reseptör antagonisti uygulandığında hepatik apelin sentezinin azaldığı bulunmuştur. Bu bulgular apelinin, All ve ET-1'in tetiklediği fibrojenik etkilere aracılık ettiğini ve apelinin insan karaciğer hastalığında fibrogenezisin önemli bir mediyatörü olduğunu düşündürmektedir (157). Yine sıçanlarda CCl_4 ile indüklenen siroz modelinde is APJ reseptörü F13A ile bloke

edildiğinde fibrotik alanların daha az olduğu gösterilmiştir. Fibrozis gelişiminin önlenmesi, karaciğer dokusunda damarlanmanın azalması, makrofaj infiltrasyonunun azalması, apoptotik hücrelerin (TUNEL pozitif) azalması ve kaspaz-3 yoğunluğunun baskılanması ile sağlanmıştır. Yine bu çalışmada PDGF- β , α -SMA, MMP2 ve TIMP1 genlerini ekspresyonu F13A tedavisi ile baskılanmıştır (158).

Bu bilgiler ışığında, üreter obstrüksiyon modelinde fibrozis gelişiminde apelin ekspresyonu fibrozis gelişimine olumlu yada olumsuz yönde katkıda bulunuyor olabilir. Bu etkilerini; NO sentezini artırarak (12) ateroskleroz modelinde olduğu gibi anjiotensin II etkilerini baskılayarak gösteriyor olabilir (159, 160). Dolayısıyla UUO modelinde artan inflamatuvar cevap da, apelin ekspresyonunu artırarak inflamatuvar ve fibrotik cevabı sınırlandırarak koruyucu bir etki gösteriyor olabilir. Diğer taraftan aort anevrizma modelinde apelin infüzyonu ile inflamatuvar cevap baskılanmış ve anevrizma gelişimi önlenmiştir (156). Dolayısıyla apelin inflamatuvar cevabı baskılayarak da koruyucu etki gösteriyor olabilir. Bu veriler eşliğinde apelin veya apelin antagonistinin UUO modelinde fibrozis ve inflamasyon üzerine etkilerinin tespit edilmesi, yeni tedavi girişimlerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Kullanılan Deneş Hayvanları ve Deneş Protokolü

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deneşel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı, Deneş Hayvanı Araştırma Etik Kurulu'na etik ilkelere uygunluk açısından değerlendirilmek üzere başvuruldu. 29 şubat 2012 tarihli, 28.2012.mar protokol kodlu belge ile onay alındı.

Çalışmada Marmara Üniversitesi Deneş Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından temin edilen 300 – 350 gram ağırlığında erkek Wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Tüm denekler için gerçekleştirilen uygulamalar "Laboratuvar Hayvanları Kullanımı ve Bakımı Kılavuzu"na uygun olarak planlandı. Denekler deneş öncesinde iki haftalık sürede laboratuvar koşullarına (22 °C ± 2, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) alıştırdıktan sonra deneş protokolüne göre gruplara ayrıldılar.

Tek Taraflı Üreter Obstrüksiyon Modeli ve Renal Fibrozis

Dokuz – on iki haftalık sıçanlar bir hafta süreyle laboratuvar ortamında tutularak ortama alışmaları sağlandı. Bütün işlemler "Helsinki Deklerasyonu" ve "Hayvan Bakım ve Klavuzlarına" göre yapıldı.

Cerrahi işlemler öncesinde sıçanlarda intraperitoneal ketamin (100 mg/kg) ve klorpromazin (0.75 mg/kg) enjeksiyonu ile genel anestezi oluşturuldu. Sonra sıçanların bir kısmına düşük abdominal insizyon uygulanarak sol üreter distali 2.0 mersilenle iki kez bağlandı. Kontrol grubuna ise sadece düşük abdominal insizyon yapılarak üreterlere ulaşıldı ancak üreterlere ligasyon yapılmadı.

Deneş Grupları

Sıçanlar aşağıdaki gruplara ayrıldı:

1. Kontrol grubu (n=8): Kontrol grubunda alt karın insizyonu yapılarak üreterlere ulaşıldı ancak üreterlere ligasyon yapılmadı. Operasyon günü başlamak üzere 7 gün süreyle apelin çözücüsü olan saline (hacim 1 ml/kg/gün) günlük intraperitoneal olarak uygulandı.

2. Saline (SF) grubu (n=8): Bu grupta alt karın insizyonu yapılarak sıçanların sol üreterleri distalinden 2.0 mersilenle iki kez bağlandı. UUO işleminin hemen

ardından başlamak üzere 7 gün süreyle apelin ve ala-apelin çözücüsü olan saline, (hacim 1 ml/kg/gün) günlük olarak uygulandı.

3. Apelin grubu (n=8): Alt karın insizyonu ile sol üreter distalinden 2.0 mersilenle iki kez bağlandı. UUU işleminin hemen ardından başlamak üzere 7 gün süreyle apelin-13, 50 µg/kg (hacim 1 ml/kg/gün) dozunda günlük olarak uygulandı.

4. Ala-apelin grubu (n=8): Alt karın insizyonu ile sol üreter distalinden 2.0 mersilenle iki kez bağlandı. UUU işleminin hemen ardından başlamak üzere 7 gün süreyle APJ reseptör antagonisti olan ala-apelin (apelin-13Ala), 75 µg/kg (hacim 1 ml/kg/gün) dozunda günlük olarak uygulandı.

Böbrek Dokusu Örneklerinin Alınması

UUU modeli oluşturulduktan 7 gün sonra, sıçanlardan eter anestezisi ile üreterine ligasyon uygulanan sol böbrekler tüm gruplarda çıkartılıp uygun parçalara bölündükten sonra böbreklerin bir kısmı hemen lökosit izolasyonu için kullanıldı, bir kısmı %10 formol içinde saklanıp, daha sonra parafin blokları içine gömüldü, bir kısmı da direk olarak -80 C'de dondurularak saklandı.

Değerlendirme Parametreleri

Böbrek dokusunda myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçümü

Dokular ilk önce 20 mM K_2HPO_4 (pH=7.4) çözeltisi ile sulandırılıp Ultra Turrax T25 doku homojenizatöründe (Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik) homojenize edildikten sonra 12.000 devirde 10 dakika süreyle 4 °C'de santrifüje (Universal 16R, Hettich Zentrifugen) edildi. Pellet, aynı hacimde %0.5'lik heksadesiltrimetilamonyum hidroksit içeren 50 mM K_2HPO_4 ile yeniden homojenize edildi. MPO aktivitesi, o-dianizidin 2HCl'nin H_2O_2 'e bağımlı oksidasyonunun spektrofotometrik (Pharmacia LKB-Ultraspec III) ölçülmesi ile saptandı. Bir ünite enzim aktivitesi, 460 nm'de 3 dakika boyunca absorbansta değişikliğe neden olan MPO miktarı olarak tanımlandı. MPO aktivitesi Ünite/gram olarak ifade edildi. Bir ünite MPO aktivitesi 25 °C'de dakikada 1 mmol H_2O_2 indirgenmesi olarak tanımlandı (161).

Lipit peroksidasyon (MDA) ölçümü

Doku örneklerinden 150–300 miligram alındı ve % 10'luk trikloroasetik asit (TCA) ile % 10'luk homojenat hazırlandı. Bu homojenatlar dakikada 3000 devirde, 4 °C'de 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatantlar başka bir tüpe alınarak dakikada 15.000 devirde, 4°C'de 8 dakika süre ile tekrar santrifüj edildi. Süpernatant örnekleri % 0.67'lik tiyobarbitürik asit (TBA) ile 100°C'deki su banyosunda 15 dakika kaynatılarak inkübe edildi ve absorbans değerleri 535 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrede okundu. Lipit peroksidasyon düzeyi nmol MDA/gr doku şeklinde ifade edildi (161).

Glutasyon (GSH) ölçümü

Hücre içi önemli bir antioksidan olan glutasyonun düzeyinin ölçümü için lipit peroksidasyonu ölçümünde ayrılan süpernatantlar kullanıldı. Aynı süpernatant örneklerine 0.3 M Na₂HPO₄ ve Ellman ayırıcı (DTNB ve sodyum sitrat tamponu) eklendi. Karanlıkta 10 dakika bekletilen tüpler spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Sonuçlar nmol GSH/gr doku şeklinde ifade edildi (161).

Lenfositlerin izolasyonu ve flow sitometrik analiz

Böbrek dokuları 6 cm çaplı hücre kültür plaklarında 10 ml %10 fetal kalf serum ilave edilmiş RPMI solüsyonu içerisinde mekanik olarak parçalandı. Daha sonra bu solüsyona kollajenaz enzimi (catalog no: C0130, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) eklendi. Bir saat süreyle 37 °C'de inkübasyondan sonra debriler süzülerek uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler Ficoll üzerine yayılarak santrifüje edildi ve mononükleer hücreler izole edildi. Bu işlemden sonra %0.9 salin (SF) ile 2 kez yıkama yapıldı. Ardından elde edilen hücre süspansiyonu üzerine PE işaretli mouse anti-rat CD45 (catalog no:554878), APC işaretli mouse anti-rat CD3 (catalog no:557030), FITC işaretli mouse anti-rat CD4 (catalog no:554843), ve PerCp işaretli mouse anti-rat CD8 (catalog no:558824) eklendi. Bütün antikolar BD Pharmingen, San Jose, CA, USA'den temin edildi. Bu işlem sonrası, hücreler üç kez yıkayıp Üniversitemiz İmmünoloji Bilim Dalı Laboratuvarında bulunan Becton Dickinson FACS cihazı (Becton Dickinson) ile CD45, CD3, CD4 ve CD8 hücre popülasyonları belirlendi (162).

Histolojik İncelemeler

Işık mikroskopi incelemeleri için böbrek dokusu örnekleri %10 nötral-tamponize formalin ile fikse edilip parafin bloklara gömüldü. Histokimyasal boyamalar sırasında parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler seri olarak alkol ile dehidrate edildi. Ardından kesitler H&E ve Gomori tek basamaklı Trikrom boyaları ile boyandı. Tübüler hasar skoru ödem, konjesyon, hyalinizasyon, tübüler dejenerasyon ve tübüler dilatasyon skorlarının toplamı ile elde edildi. Her bir parametre için lezyonlar 0 – 4 arasında skorlandı. Bu skorlama da derecelendirme şu şekilde yapıldı; 0=normal; 1= hafif ve kortikal alanının <%25 alanının etkilenmesi; 2=,orta derecede ve kortikal alanın %25-50 etkilenmesi; 3=ağır ve kortikal alanın %50-75 etkilenmesi; 4=yaygın ve kortikal alanın >75 etkilenmesi (163).

Mikroskop altında 400 kez büyütme ile 5 farklı kortikal bölgede interstisyel kollajen birikimi skorlandı. Kesitlerin incelemesi ve skorlaması her böbrekte kör yöntemle iki kişi (Dr. Naziye Özkan ve Prof. Dr. Şule Çetinel) tarafından değerlendirildi. Morfolojik hasar (epitelyal nekroz, luminal nekrotik debris ve tübüler dilatasyon) her bir böbrekte 3-4 kesitte ve her kesit için 10-12 alanda etkilenen kesit yüzeyine göre şu ölçek kullanılarak tespit edildi (0=yok, 1= <%25, 2=%25-50, 3%50) kullanılarak değerlendirildi (164).

Dokularda İmmunohistokimyasal Yöntemle Belirteçlerin Tayini

Bütün immünhistokimyasal çalışmalar parafin bloklarından yapıldı. İmmünhistokimyasal boyamalarda streptavidin-biotin peroksidaz metodu kullanıldı (165). Kısaca, parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler pozitif yüklü lamlara yapıştırıldı. Bu kesitler gece boyunca 37°C'de kurutuldu, xylene içinde deparafinize edildi ve alkolde hidrate edildi (166). Endojen peroksidaz aktivitesi dokuların %3 H₂O₂ (metanol içinde dilüe edildi) ile 20 dakika inkübe edilmesi ve ardından su ile yıkanması sonrası bloke edildi. Antijenleri açığa çıkartmak amacıyla slaytlar 10 mM sitrat tamponu içinde (pH 6.0) mikrodalga fırınında 20 dakika süre ile tutuldu. Daha sonra dokular fosfat tamponlu salinle (PBS, pH 7.4) yıkandı. Endojen biyotin aktivitesi, "avidin-biotin blokaj kiti" (catolog no:04303, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kullanılarak bloke edildi. Spesifik olmayan boyanmayı azaltmak amacıyla dokular "Super Block" (SensiTek HRP Anti-

Polyvalent DAB Staining System kiti, ScyTek Laboratories, Utah, USA) ile 10 dk süreyle inkübe edildi. Dokular daha sonra α -SMA'e karşı poliklonal antikorla (catolog no: NCL-SMA, Novocastra, Davie, IL, USA) 60 dk boyunca inkübe edildiler. PBS ile yıkama sonrası, biyotinli sekonder antikorla inkübe edildiler. Tekrar yapılan yıkama sonrası peroksidaz konjuge streptavidine (SensiTek HRP Anti-Polyvalent DAB Staining System, ScyTek Laboratories, Utah, USA) ile inkübasyon yapıldı. Boyanma 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ile sağlandı. Mayer hematoxylin boyası ile nükleer zıt boyanma yapıldı. Dokulardaki damar boyanmaları pozitif kontrol olarak kullanıldı.

α -SMA aktivitesi tübülointerstisyumda şu şekilde skorlandı: 0: boyanma yok, 1: zayıf ve fokal boyanma, 2: orta derecede ve fokal boyanma, 3: güçlü ve fokal boyanma ya da zayıf ancak yaygın boyanma, 4: güçlü ve yaygın boyanma (166).

Böbrek Dokusunda Apoptozis Tespiti ve Skoruması

Apoptozis skoru parafin dokuda terminal deoxynucleotidyl transferase aracılı dUTP nick end-labeling (TUNEL assay) yöntemi (Millipore, catalog no:S7101; Temecula, CA, USA) ile yapıldı. Böbrek dokusu kesitleri deparafinize edilip rehidrate edildi. Kesitler daha sonra 20 mg/ml proteinaz K ile oda havasında 10 dakika süreyle inkübe edildi. Endojen peroksidaz aktivitesi dokuların %3 H₂O₂ (PBS içinde, pH 7.4) ile 5 dakika inkübe edilmesi ortadan kaldırıldı. Ardından 37 °C'de 60 dakika süreyle inkübasyon ile nükleotidlerin enzimatik inkorporasyonu gerçekleştirildi. Ardından inkübasyon işlemi durdurularak iki kez PBS ile yıkama yapıldı. Kesitler, ardından Anti-digoxigenin-peroxidase ile 30 dk süreyle inkübe edilip yıkandı. Ardından preparatlar 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride ile 6 dakika süreyle oda havasında inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra % 0.5 metal yeşili ile de boyama yapılarak ışık mikroskopisi altında 5 kesitte toplam 20 interstisyel bölgedeki TUNEL-pozitif hücreler sayıldı. Tüm alanlardaki toplam apoptotik hücre sayısı apoptotik indeks olarak rapor edildi (167).

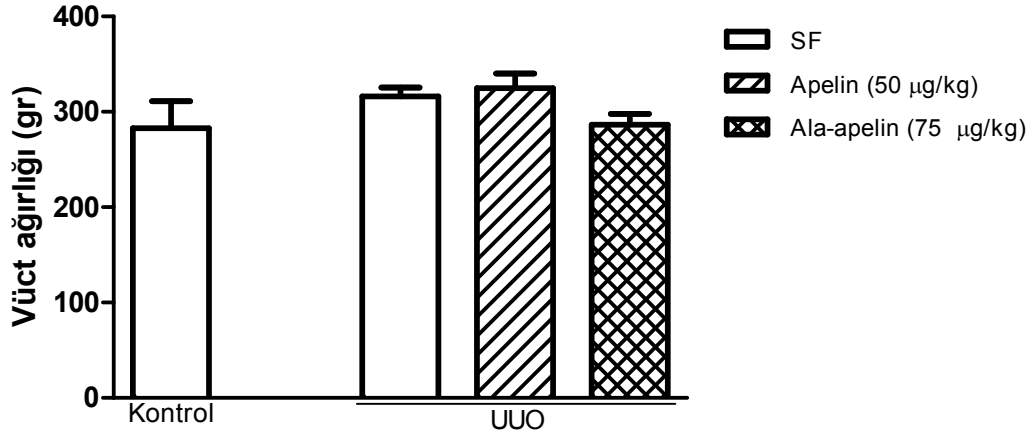
İstatistiksel Analiz:

Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler için GraphPad Software istatistik programı kullanıldı. Verilerin gruplar arasında

karşılaştırılmasında sırasında Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan sıçanların vücut ağırlıkları çalışma sonunda kontrol, SF, apelin ve ala-apelin gruplarında sırasıyla 282 ± 28 gr, 316 ± 9 gr, 324 ± 15 gr ve 286 ± 11 gr olmak üzere benzerdi (Şekil 1).



Şekil 1: Çalışma gruplarının vücut ağırlıkları

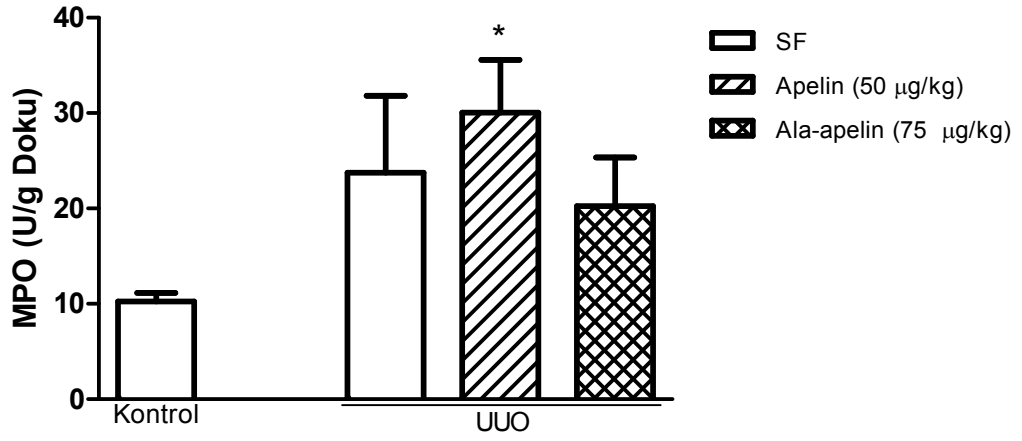
UUO modeli uygulanan sıçanlarda çalışma bitiminde hepsinde üreter obstrüksiyonun geliştiği ve hidronefroz geliştirdikleri görüldü (Resim 1).



Resim 1: Tek taraflı üreter obstrüksiyonu uygulana böbrekte üreterde ve renal pelviste dilatasyon

Nötrofil İnfiltrasyonu, Oksidatif Stress ve Glutasyon Seviyeleri

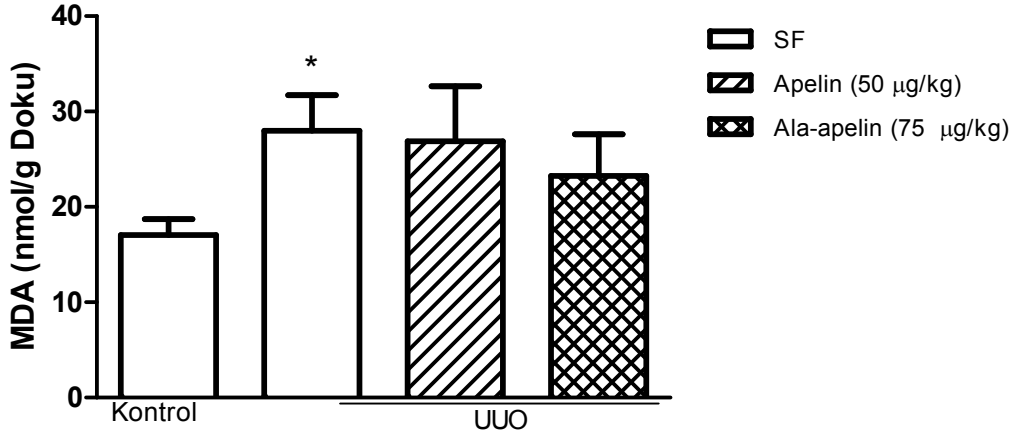
Üreter obstrüksiyonu sırasında interstisyel bölgeye nötrofil infiltrasyonu olabilmektedir. Nötrofil infiltrasyon belirteci olarak doku lizatlarında MPO aktivitesine baktığımızda SF grubunda MPO aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla artış göstermesine rağmen bu artışın istatistiksel anlamlaştığını tespit ettik (10.3 ± 0.9 U/g doku vs 23.8 ± 8.1 U/g doku, $p > 0.05$). Bu değerler apelin grubunda 30.0 ± 5.5 U/g doku olmak üzere kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.01$). Ala-apelin tedavisi ile bu değer 20.3 ± 5.1 U/g doku olmak üzere kontrol grubundan farklılık göstermedi. Apelin ve ala-apelin tedavileri MPO değerlerini SF grubuna kıyasla anlamlı olarak değiştirmediler (Şekil 1).



Şekil 2: Çalışma gruplarında MPO değerleri

* $p < 0.01$ vs kontrol grubu

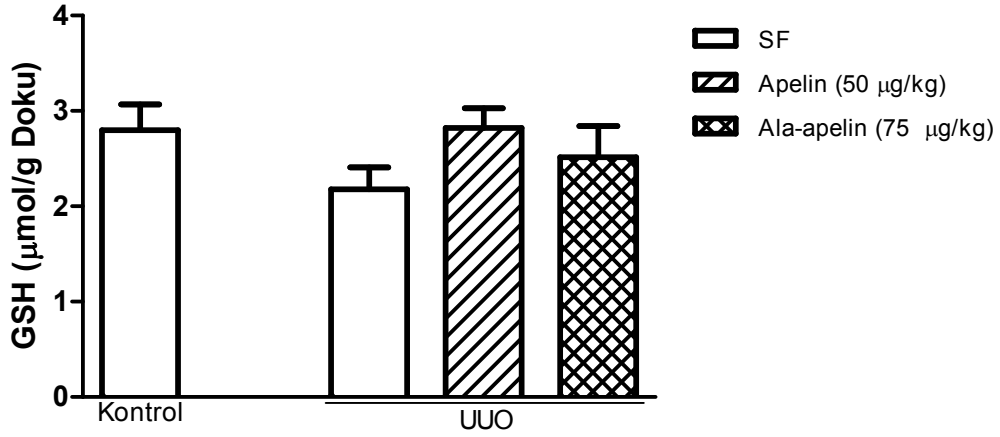
Çalışmamızda oksidatif stres belirteci olarak böbrek dokusunda MDA düzeylerini inceledik. MDA düzeyleri SF grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldi (17.1 ± 1.7 nmol/g doku vs 28.0 ± 3.8 nmol/g doku, $p < 0.05$). MDA değerleri apelin ve ala-apelin gruplarında sırasıyla 26.8 ± 3.8 nmol/g doku ve 23.3 ± 4.4 nmol/g doku, olmak üzere kontrol grubu ve SF grupları ile istatistiksel olarak benzerdi (Şekil 3).



Şekil 3: Çalışma gruplarında MDA seviyeleri

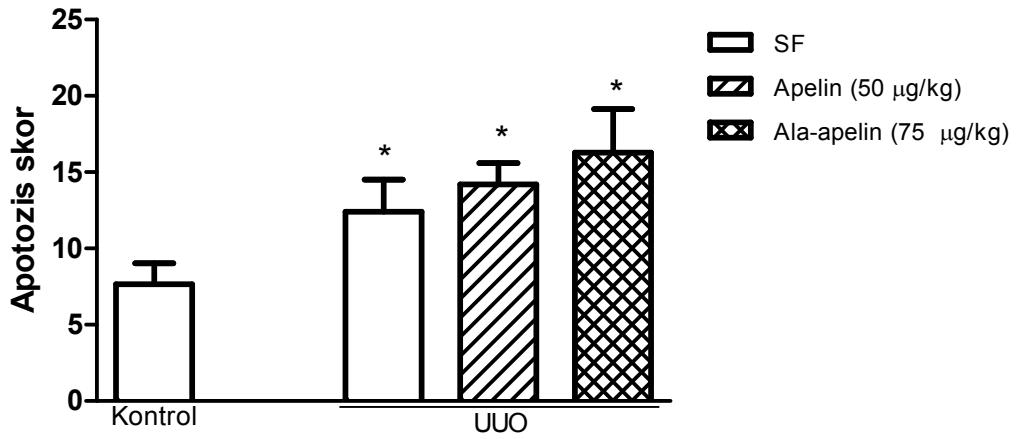
* $p < 0.05$ vs kontrol grubu

Doku GSH seviyeleri incelendiğinde ise kontrol, SF, apelin ve ala-apelin gruplarında sırasıyla 2.8 ± 0.3 µmol/g doku, 2.2 ± 0.2 µmol/g doku, 2.8 ± 0.2 µmol/g doku, 2.5 ± 0.2 µmol/g doku olmak üzere GSH grupları arasında istatistiksel olarak benzer bulundu (Şekil 4).



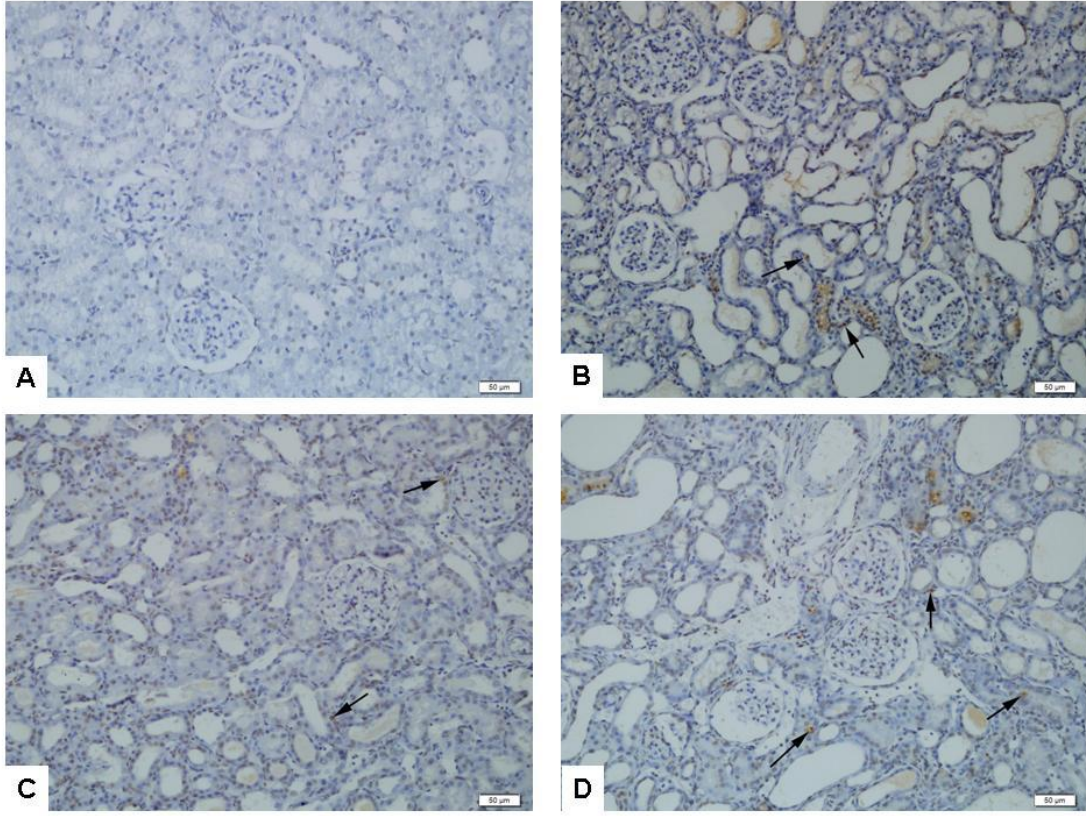
Şekil 4: Çalışma gruplarında GSH seviyeleri

Apoptozis skorunu incelediğimizde SF grubunda apoptozis skoru kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldi (7.7 ± 1.4 vs 12.4 ± 2.1 , $p < 0.05$). Apelin (14.2 ± 1.4) ve ala-apelin tedavileri ile (16.3 ± 2.8) bu skorlar kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek olmakla birlikte SF grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık göstermedi (Resim 2, Şekil 5).



Şekil 5: Çalışma gruplarında apoptozis skorları

* $p < 0.05$ vs kontrol grubu



Resim 2: Çalışma gruplarında böbrek dokusunda UUO gerçekleştirildikten 7 gün sonra TUNEL tekniği ile belirlenen apoptozis skoru
A:Kontrol grubu; B:SF grubu; C:apelin grubu; D:ala-apelin grubu.
Kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda apoptotic hücrelerin (bkz oklar) sayısı anlamlı olarak arttı.

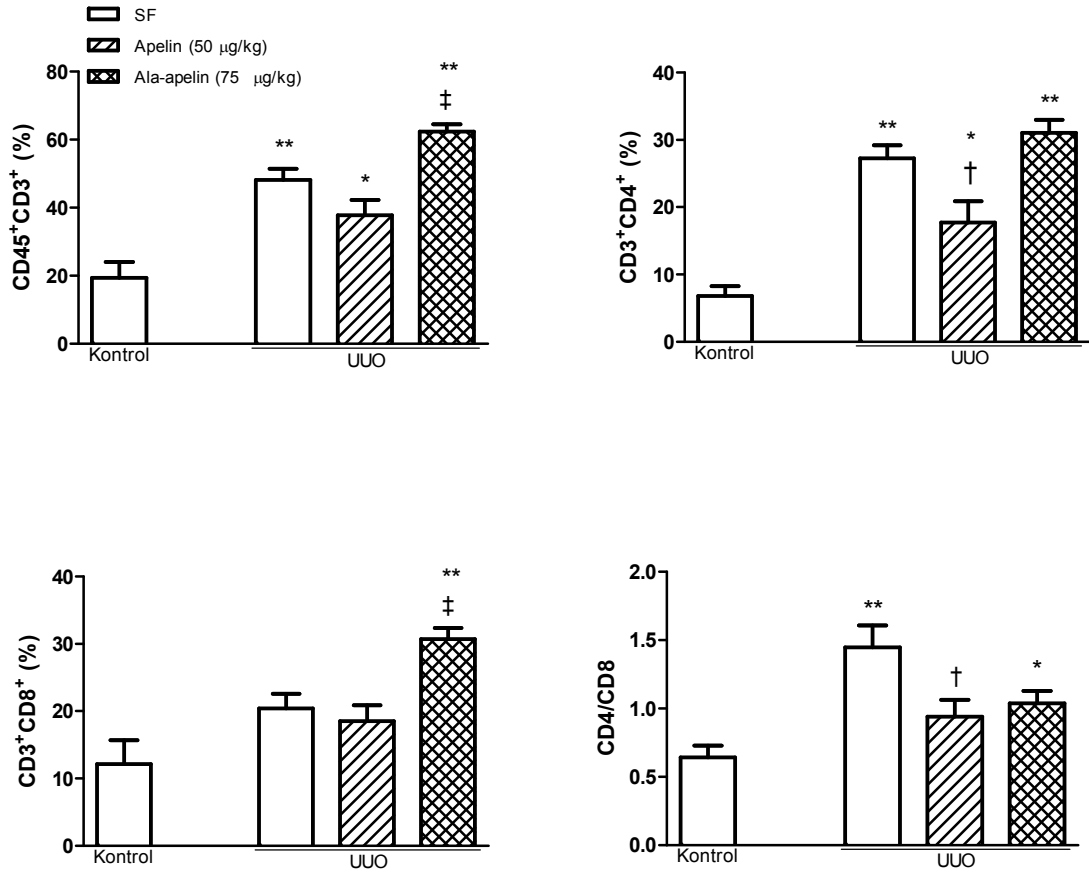
Lenfomononükleer hücre infiltrasyonunu incelediğimizde SF grubunda kontrol grubuna kıyasla $CD3^+$ lenfosit infiltrasyonunun arttığını tespit ettik (48.2 ± 3.3 vs 19.4 ± 4.7 , $p < 0.001$). $CD3^+$ hücre infiltrasyonu apelin (37.8 ± 4.5 , $p < 0.05$) ve ala-apelin tedavileri gruplarında da (62.4 ± 2.2 , $p < 0.001$) olmak üzere kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti. Apelin grubundaki $CD3^+$ hücre infiltrasyonu SF grubuna kıyasla bir miktar azalmakla birlikte bu azalma anlamlı değildi. Buna karşın ala-apelin grubundaki $CD3^+$ hücre infiltrasyonu saline grubuna kıyasla anlamlı olarak artış gösterdi ($p < 0.01$) (Şekil 6).

Böbrek dokusunu infiltre eden lenfosit alt hücre tipleri incelendiğinde kontrol grubunda 6.6 ± 3.6 olan $CD4^+$ hücre oranı SF grubunda 27.2 ± 6.2 'ye yükseldi

($p < 0.001$). Bu değerler apelin grubunda 17.7 ± 8.4 ($p < 0.01$) ve ala-apelin grubunda da 31.1 ± 5.5 olmak üzere kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.001$). Apelin tedavisi ile $CD4^+$ hücre oranı SF grubuna kıyasla anlamlı olarak azalma gösterdi ($p < 0.05$). Ala apelin grubunda ise değişim izlenmedi (Şekil 6).

Böbrek dokusunu infiltre eden $CD8^+$ hücre oranları incelendiğinde kontrol grubunda 12.2 ± 3.5 olan $CD8^+$ hücre oranı SF grubunda 20.4 ± 2.2 'ye yükseldi ($p < 0.001$). Bu değerler apelin grubunda 18.5 ± 2.4 olmak üzere kontrol grubuna benzer ve ala-apelin grubunda da 30.7 ± 1.6 olmak üzere kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Apelin tedavisi ile $CD8^+$ hücre oranı SF grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik göstermez iken ala-apelin tedavisi ile $CD8^+$ hücre oranları anlamlı olarak artış gösterdi ($p < 0.01$) (Şekil 6).

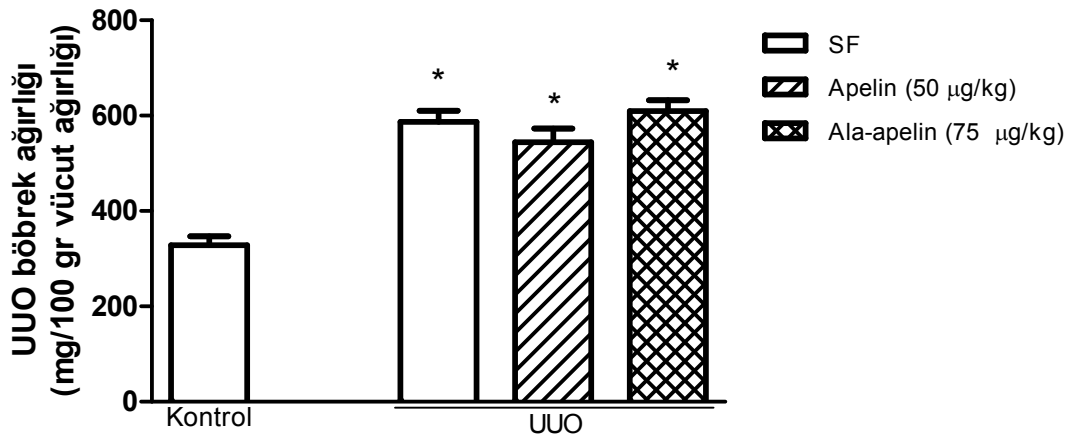
Lenfosit alt hücre gruplarının infiltrasyonunu daha iyi gösterebilecek bir parametre olarak $CD4/CD8$ hücre oranlarına baktımızda bu oranın kontrol grubuna kıyasla SF grubunda (0.64 ± 0.09 vs 1.54 ± 0.16 , $p < 0.001$), anlamlı olarak yükseldiğini tespit ettik. Apelin tedavisi ile $CD4/CD8$ hücre oranı anlamlı olarak azaldı (1.54 ± 0.16 vs 0.94 ± 0.12 , $p < 0.05$). Buna karşın ala-apelin tedavisi ile bu farklılık anlama ulaşmadı (1.54 ± 0.16 vs 1.04 ± 0.09 , $p > 0.05$) (Şekil 6).



Şekil 6: Çalışma gruplarında lenfosit düzeyleri

*p<0.05 vs kontrol grubu, **p<0.001 vs kontrol grubu, †p<0.05 vs SF grubu, ‡p<0.05 vs SF grubu

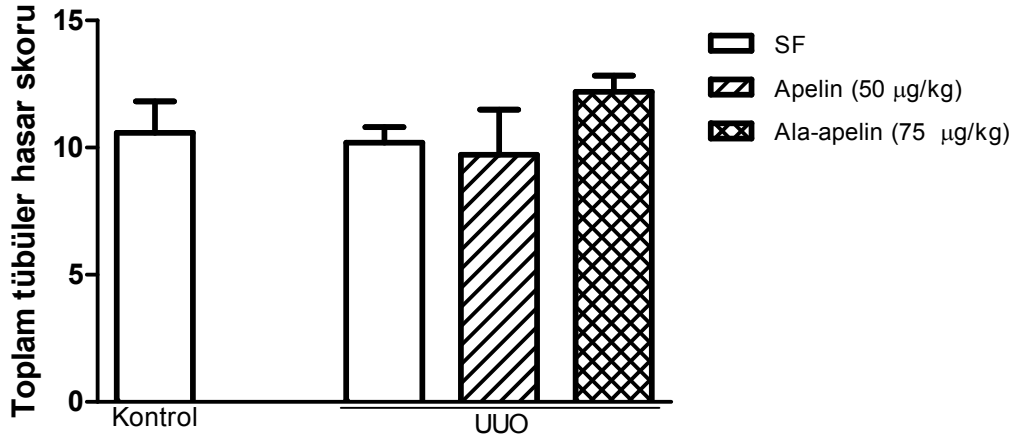
UUO geliştirilen sol böbreklerin ağırlıklarının 100 gram vücut ağırlığı başına oranlarının kontrol, SF, apelin ve ala-apelin gruplarında sırasıyla 328 ± 19 mg, 587 ± 23 mg, 544 ± 28 mg ve 609 ± 23 mg olduğu görüldü. SF, apelin ve ala-apelin gruplarının UUO uygulanan böbrekleri kontrol grubundan anlamlı olarak ağırdı ($p < 0.001$). Buna karşın apelin ve ala-apelin gruplarının UUO uygulanan böbreklerinin ağırlıkları SF grubu ile benzerdi (Şekil 7).



Şekil 7: Çalışma gruplarında üreter obstrüksiyonu uygulanan böbreklerin ağırlıkları

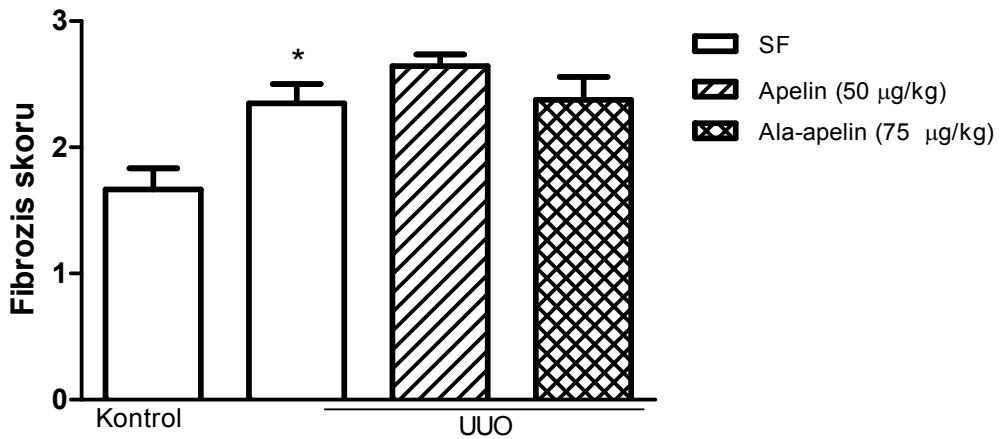
* $p < 0.001$ vs kontrol grubu

H&E boyaması ile skorlanan ve interstisyel ödem, konjesyon, hyalinizasyon, tübüler dejenerasyon ve tübüler dilatasyon skorlarının toplamı ile elde edilen tübüler hasar skoru kontrol, SF, apelin ve ala-apelin gruplarında sırasıyla 10.6 ± 1.2 , 10.2 ± 0.6 , 9.7 ± 1.8 , 12.2 ± 0.6 olmak üzere gruplar arasında benzer bulundu (Resim 3, Şekil 8).



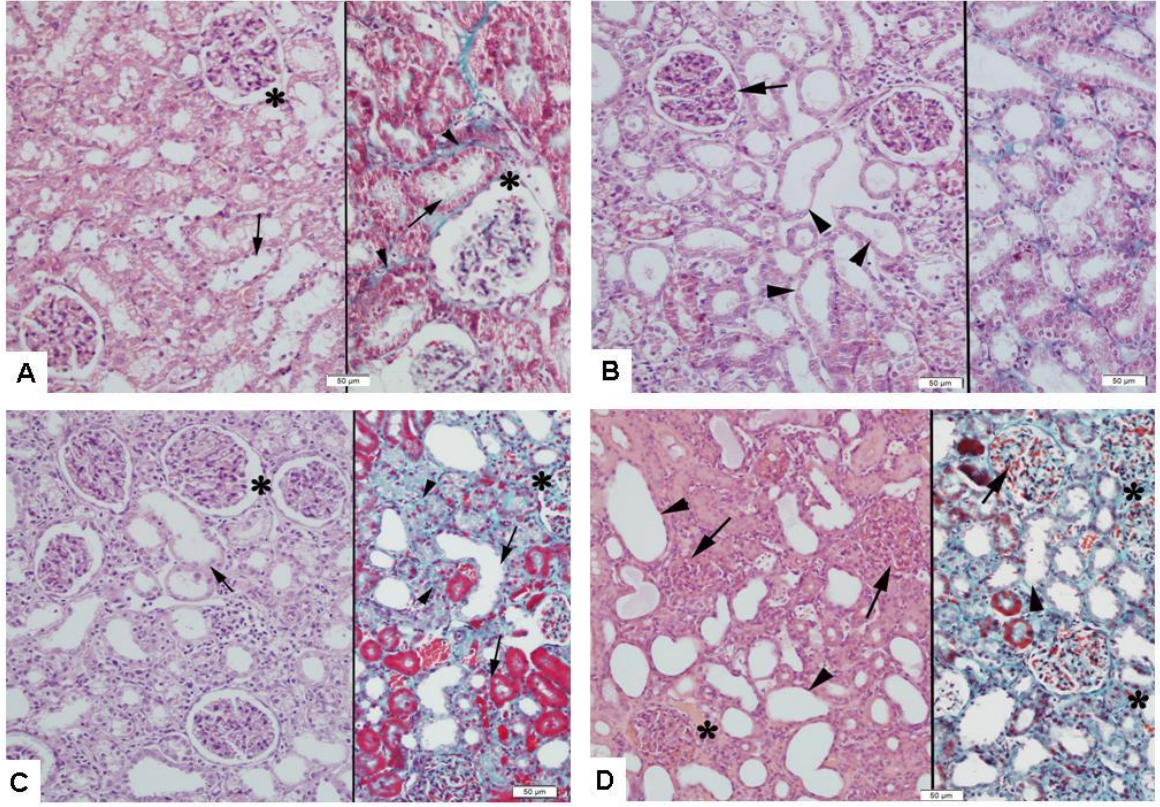
Şekil 8: Çalışma gruplarında trikrom boyası ile elde edilen fibrosis skorları

Trikrom boyaması ile elde interstisyel fibrozis skoru SF grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yükselme gösterdi (1.67 ± 0.17 vs 2.35 ± 0.15 , $p < 0.05$). Apelin ve ala-apelin gruplarında elde edilen skorlar sırasıyla 2.64 ± 0.10 ve 2.38 ± 0.18 olmak üzere kontrol grubundan farklı değildi (Resim 3, Şekil 9).



Şekil 9: Çalışma gruplarında trikrom boyası ile elde edilen fibrosis skorları

* $p < 0.05$ vs kontrol grubu

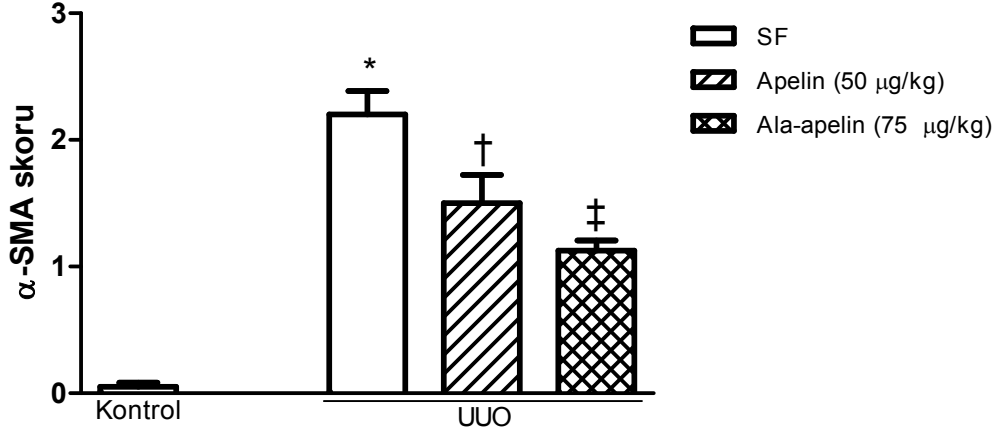


Resim 3: Çalışma gruplarında böbrek dokusunda UUO gerçekleştirildikten 7 gün sonra alınan böbrek dokularında H&E ve trikrom boyaları. H&E boyaması ile tübüler hasar ve trikrom boyaması ile fibrozis skorlaması yapıldı.

A: Kontrol grubu; B: SF grubu; C: apelin grubu; D: ala-apelin grubu.

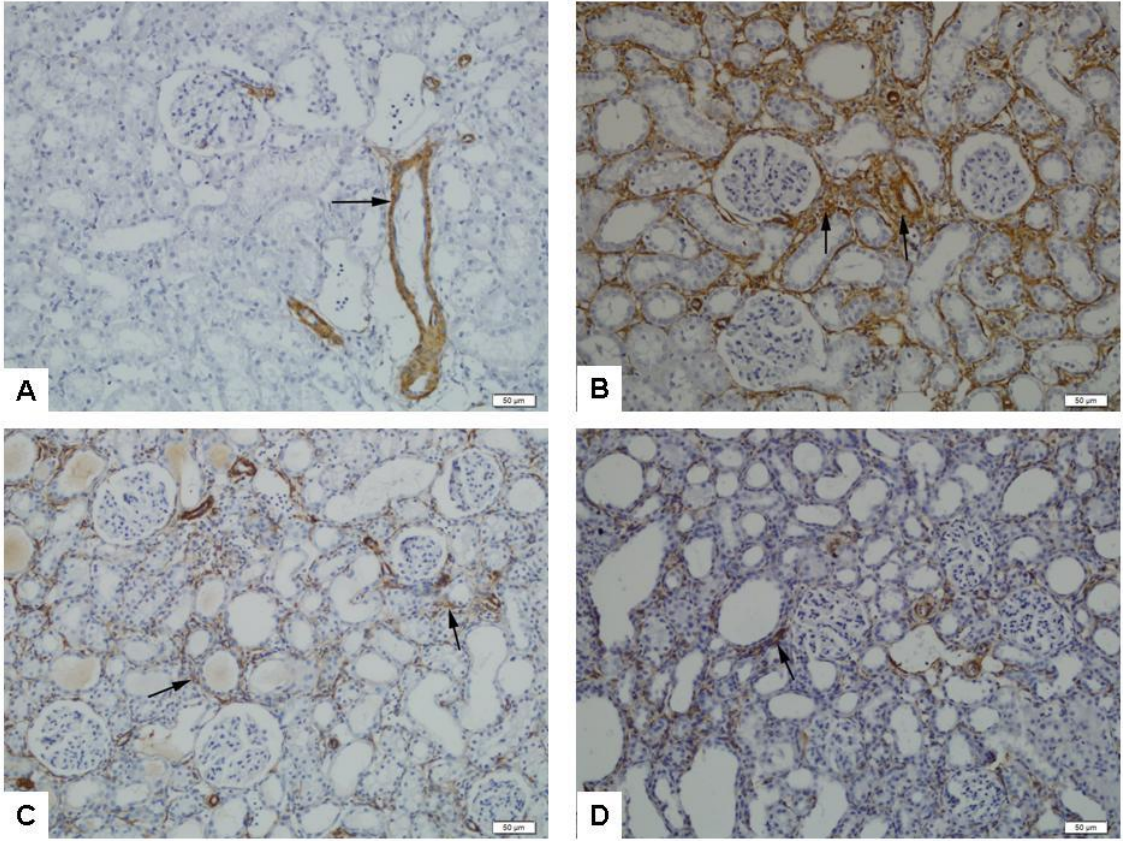
Kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda tübüler dilatasyon, hücre infiltrasyonu ve tübüler nekroz anlamlı olarak belginleşti (bkz. oklar). H&E boyalarına komşu resilerde görüldüğü üzere trikromla tespit edilen fibrozis skorları kontrol grubuna kıyasla SF, apelin ve ala-apelin anlamlı olarak yükseldi.

İnterstisyel fibrozisin bir başka belirteci olarak α -SMA aktivitesini incelediğimizde kontrol grubunda aktivite izlemezken (0.0 ± 0.0), SF grubunda bu skorun 2.2 ± 0.2 yükseldiğini ($p < 0.001$) gördük. Apelin tedavisi ile bu skor 1.5 ± 0.2 olmak üzere anlamlı olarak geriledi ($p < 0.05$). Benzer şekilde ala-apelin tedavisi ile de bu skor (1.1 ± 0.1) anlamlı olarak geriledi ($p < 0.05$) (Resim 4, Şekil 10).



Şekil 10: Çalışma gruplarında α -SMA ekspresyonu

* $p < 0.001$ vs kontrol grubu, † $p < 0.05$ vs SF grubu, ‡ $p < 0.05$ vs SF grubu



Resim 4: Çalışma gruplarında böbrek dokusunda UUO gerçekleştirildikten 7 gün sonra α -SMA skoru.

A: Kontrol grubu; B: SF grubu; C: apelin grubu; D: ala-apelin grubu.

Kontrol grubunda sadece damar duvarında α -SMA aktivitesi izlenirken, SF grubunda α -SMA aktivitesi anlamlı olarak azaldı. α -SMA aktivitesi apelin ve ala-apelin gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla artmakla birlikte SF grubuna kıyasla anlamlı olarak azalma gösterdi.

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

UUO modelinde kısa sürede fibrozis gelişir. Bu nedenle bu model fibrozis mekanizmalarını ve fibrozis tedavisinde kullanılabilecek ajanların etkinliğini kısa sürede değerlendirebilmek için sıklıkla kullanılan bir modeldir. Çalışmamızda apelin sisteminin renal fibrozis gelişimindeki rolünü UUO modelinde apelin ve APJ reseptör antagonisti ala-apelin kullanarak inceledik. Sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde apelin uygulanmasının böbrek dokusuna T lenfosit infiltrasyonunu baskıladığını, ala-apelin uygulanması ile bu etkinin ortadan kalktığını, dokuyu infiltre eden lenfosit alt grubunun ise CD4⁺ T hücreleri olduğunu ve yine ala-apelin uygulanması ile CD4⁺ hücre infiltrasyonunun tekrar arttığını gösterdik. α-SMA aktivitesi ise gerek apelin ve gerekse de ala-apelin uygulanması ile baskılanırken trikrom boyaması ile tespit ettiğimiz fibrozis derecesinde herhangi bir değişim izlemedik.

Çalışmamızda nötrofil ve makrofajların dokulara infiltrasyonunu gösteren bir parametre olarak MPO aktivitesinin gruplar arasında farklılık göstermediğini tespit ettik. Bu bulgumuz literatür bulgusu ile uyum göstermemektedir. Demirbilek ve ark. yaptıkları çalışmalarında UUO uygulayıp salin verdikleri gruplarında kontrol grubuna kıyasla MPO aktivitesinin arttığını göstermişlerdir (89). Yine bu grup sulfasalazine uyguladıkları çalışmalarında fibroziste baskılanma ve MPO aktivitesinde azalma ile birlikte lenfosit ve makrofaj hücre infiltrasyonunda da azalma rapor etmişlerdir. Çalışmamızda gerek apelin gereksede ala-apelin ile MPO aktivitesinde azalma olmaması her iki molekülün de parankimi infiltre eden nötrofil ve makrofaj sayısını baskılayamadığını düşündürmektedir.

UUO modelinde idrarın geri doğru akışı ve artmış intrarenal basınç böbreklerde iskeminin de gelişmesine neden olur. İskemik tablonun devamı ile oksidatif fosforilasyon azalır ve ATP üretimi azalır, ROS üretimi artar (168). UUO sırasında katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksid dismutaz gibi oksidatif stresi bertaraf eden enzimler tübül epitel hücrelerinde baskılandığından oksidatif hasar daha belirgin hale gelir (169). Çalışmamızda oksidatif stres belirteci olarak bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerini kullandık ve apelin ve ala-apelin tedavileri ile MDA düzeylerinde düzelme izlemedik. Buna karşın apelinin oksidatif stresi azalttığı bildirilmektedir (154). Bulgularımızın aksine Zeng ve ark. kardiyak

iskemi reperfüzyon hasarı modelinde apelin uygulanması ile anti-oksidan enzimlerin indüklendiğini göstermişlerdir (170). Day ve ark. ise diyabetik nefropati modelinde apelin uygulanması ile baskılanmış olan katalaz enzim ekspresyonunun düzeldiğini göstermişlerdir (171).

Çalışmamızda UUO oluşturulması ile (SF grubu) mononükleer hücre infiltrasyonunda literatürle uyumlu olarak artış saptadık (5). Flow sitometrik analizde gerek SF grubunda gerekse de apelin ve ala-apelin gruplarında CD3⁺ hücre infiltrasyonunun arttığı gözlemlendi. Apelin grubunda SF grubuna kıyasla CD3⁺ hücre infiltrasyonu bir miktar azalsa da bu azalma anlamlı değildi ve bu azalma ala-apelin uygulaması ile SF grubuna kıyasla anlamlı bir artışa dönüştü. Bu bulgular apelinin dokulara olan T lenfosit hücre infiltrasyonunu baskılayamadığını ancak ala-apelin uygulaması ile artan hücre infiltrasyonu apelinin UUO modelinde yine de mononükleer hücre infiltrasyonunu kısmen de olsa baskılayabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda apelin tedavisi ile CD4⁺ hücre infiltrasyonu azalmış ve bu azalma ala-apelin tedavisi ile tersine dönmüştür. Tapmeier ve ark. yaptıkları çalışmalarında CD4⁺ hücre deplesyonu ile obstrükte böbrekte fibrozis gelişmediğini göstermişlerdir (82). Son yıllarda yapılan çalışmalarla apelinin anti-inflamatuar etkileri olduğu gösterilmektedir. Hemodiyaliz hastalarında yapılan bir çalışmada apelin seviyeleri ile IL-6, TNF- α ve hsCRP seviyeleri arasında ters orantı bulunmuştur (172). Shah ve ark. fare monosit ve makrofajlarında APJ eksprese edildiğini göstermişlerdir. Özellikle makrofajların aktive edildiği durumlarda APJ ekspresyonunun arttığı ve bu makrofajlara apelin ile inkübe edildiklerinde TNF- α , MCP-1, IL-6, MIP-1 ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir (173). Bir başka çalışmada da aort anevrizma modeli kullanılmış ve apelin infüzyonu ile inflammatuar cevap baskılanmış ve anevrizma gelişimi önlenmiştir (156). Biz ise çalışmamızda makrofaj infiltrasyon skorumuzu belirlemedik. Bu sitokinlerin baskılanması çalışmamızda bulduğumuz böbrek dokusunu infiltre eden yardımcı-T hücre sayısındaki azalma ile uyumlu olabilir. Çalışmamızda yardımcı T hücrelerinin sayılarının azalması ile inflamasyonun baskılanmasını bekleyebilirdik. Ancak çalışmamızda hücre infiltrasyonu dışında inflamasyonu tespit etmek amacıyla TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi sitokinlerin ekspresyonuna bakamadık. Beklentilerin aksine çalışmamızda fibrozisi

baskılanmış olarak tespit edemedik. Bu durum ise apelinin anti-inflamatuar etkilerinin endotel ve düz kas hücrelerinde gösterilememesi ile açıklanabilir (174).

Çalışmamızda SF grubunda kontrol grubuna kıyasla apoptozi skoru artmıştır. Bu bulgu literatür bulguları ile uyumludur (37, 175). Apelin ve ala-apelin uygulamaları ise apoptozis skorunu çalışmamızda azaltmamıştır. Tao ve ark. kardiyak iskemi reperfüzyon hasarı modelinde apelin uygulanması ile apoptozisin baskılandığını göstermişlerdir (176). Buna karşın hepatik fibrozis modelinde ala-apelin uygulanmasının apoptotik hücre sayısını ve kaspaz-3 ekspresyonu baskıladığı rapor edilmiştir (158). Çalışmamızda sitokin seviyelerini henüz ölçemedik. Ancak çalışmamızda CD4⁺ lenfositler azalmıştır. CD4⁺ hücrelerin özellikle Th1 alt grubu IL-6, TNF- α gibi 'proinflamatuvar' sitokinlerin salgılanmasını arttırmaları. Bu moleküllerden TNF- α ve makrofajlardan salgılanan TGF- β 1 gibi sitokinler apoptozis indükleyicileridir (177). Çalışmamızda bu moleküllerin azalması azalmadıklarını bilmiyoruz. Bu nedenle her ne kadar T hücre ve özellikle de yardımcı T-hücre infiltrasyonu apelin tedavisi ile azalsa da inflamatuvar yanıt özellikle sitotoksik T hücreleri (CD8⁺ hücreler) üzerinden devam ediyor olabilir. Bu nedenle apoptozis skorunda olabilecek kısmi baskılanma çalışmamızda gerçekleşmemiş olabilir. Ayrıca önemli apoptozis indükleyicilerinden ROS'de çalışmamızda azalmadı. Bu faktörde çalışmamızda apelin ve ala-apelin gruplarında apoptozisi tetiklemeye devam etmiş olabilir (17).

Çalışmamızda α -SMA aktivitesi gerek apelin gerekse de ala-apelin alan gruplarda anlamlı olarak azalmıştır. Ancak bu bulgunun aksine fibrozis gelişimi baskılanmamıştır. Fibroblastlar aktive olduktan sonra kollajen, laminin, fibronektin ve TGF- β 1 üretirler (178). Bu moleküllerden TGF- β 1 fibroblast aktivasyonunda direkt rol alır ve α -SMA ekspresyonunda artışa neden olur. Renal iskemiden yaklaşık 45 dakika sonra mezangial hücrelerde α -SMA aktivitesi ve bu belirteci taşıyan hücrelerin proliferasyonu artarken diğer modellerde α -SMA fibroblast göçünü inhibe etmektedir (179). Literatürde α -SMA ekspresyonunda artışla fibrozis arasında bir birliktelik söz konusudur (5, 14). Buna karşın Takeji ve ark. ise α -SMA taşımayan farelerde fibrozisin daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Bu farelerden elde edilen fibroblastlar kültür ortamında α -SMA taşıyan farelerden elde edilen fibroblastlardan daha fazla tip-I prokollajen sentezlemişlerdir. Yine α -SMA taşımayan fibroblastların hareketleri de daha fazla olmuştur (180). Yine bu

çalışmada α -SMA ekspresyonu adenovirüs transfeksiyonu ile sağlandığında fibrozis gerilemiştir. Dolayısı ile çalışmamızda bulduğumuz α -SMA ekspresyonundaki azalma ile fibrozis arasında bir ilişkinin olmaması literatür ile uyumlu olabilir.

Çalışmamızda obstrüktif böbrekte trikrom boyası ile belirlediğimiz interstisyel fibrozis artarken tübüler atrofi skoru artış gösterdi. Miyajima ve ark. çalışmasında ise 13. Günde sıçanlar sakrifiye edildiklerinde interstisyel fibrozisle birlikte tübüler atrofi de belirginleşmiştir (24). Çalışmamızda apelin ve ala-apelin alan gruplarda trikrom ile belirlenen interstisyel fibrozis skoru SF ile tedavi edilen gruptan farklılık göstermemiştir. Apelinin ve ala-apelinin renal fibrozis üzerine etkileri gerek glomerülo nefrit gerekse de UUO modellerinde çalışılmamıştır. Ancak diyabetik nefropati modelinde apelin uygulanması ile diyabetik nefropatinin ilerlemesi önlenmiştir (171). Bu modelde glomerüller hipertrofi, monosit kemoatraktan protein-1, vasküler adhezyon molekül-1, NF-KB aktivasyonu, monosit infiltrasyonu gibi inflamasyon parametreleri baskılanmıştır. Altı aylık tedavi sonunda da proteinüri azalmış ve katalaz enzim aktivitesindeki baskılanma (down regülasyon) geri çevirilmiştir. Buna karşın karbon tetra klorürle oluşturulan karaciğer fibrozis modelinde ise ala-apelin (F13A) kullanılarak fibrozis üzerine etkileri incelenmiştir. F13A tedavisi ile fibrozis gelişimi anlamlı olarak baskılanmıştır. Fibrozis üzerine olumlu etkiler oluşurken karaciğeri infiltre eden CD68⁺ makrofaj hücre sayısı, apoptotik hücre sayısı azalmış ve caspase-3 ekspresyonu da baskılanmıştır (158). Diğer taraftan ala-apelin uygulanmasının da fibrozisi önlediğine dair yayınlar da bulunmaktadır. Reichenbach ve ark. yaptığı çalışmada ala-apelin tedavisi ile karaciğer dokusunda makrofaj infiltrasyonu baskılanmıştır (158).

APJ reseptörü ile AT-1 reseptörü arasındaki homoloji özelliği AT-1 reseptörü blokajının apelin tarafından APJ reseptörü üzerinden sağlanmasının Ang II etkilerini ortadan kaldırdığı bilinmektedir (181). Nitekim bir çalışmada apelin kullanımı ile Ang II tarafından indüklenen kardiyak fibrozis önlenmiştir (182). Bu bilgilere paralel olarak Nishida ve ark. apelin sisteminin etkisini UUO modelinde indirek olarak incelemişlerdir ve literatürdeki tek çalışma da budur. Ancak bu çalışmada apelin sisteminin UUO modelindeki fibrozis zerine etkileri indirek olarak incelenmiştir (181). Bu çalışmada UUO uygulanması ile apelin gen

ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Yine bu çalışmada bir gruba AT-1 reseptör antagonisti losartan verildiğinde fibrozis gelişimin önlendiği görülmüş. Bir başka grupta ise losartan ve F13A (ala-apelin) birlikte kullanıldığı zaman fibrozis tekrar artmıştır. Bu çalışmada losartanla birlikte ala-apelin verildiğinde Akt/eNOS yolağının baskılanması sonucu e-NOS ve Akt protein ekspresyonu böbrek dokusunda baskılanmış ve makrofaj infiltrasyonu da artmıştır (181). Bu bulgu indirek olarak apelinin nitrik oksid sistemi üzerinden fibrozisi UUO modelinde de önleyebileceğini düşündürebilir. Ancak UUO modelinde tek başına apelin veya ala-apelin verilen bir grubun olduğu bir çalışma bulunmamaktadır.

Sonuç olarak çalışmamızda apelin verilmesi ile CD3 ve özellikle de CD4 T hücre infiltrasyonunu ile birlikte α -SMA ekspresyonu azalsa da hem apelin hem de apelin antagonisti ala-apelin verilmesinin UUO modelinde renal fibrozisi önleyemediği gösterilmiştir.

6. KAYNAKÇA

1. Bohle, A., Muller, G. A., Wehrmann, M., Mackensen-Haen, S., and Xiao, J. C. (1996) Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides, *Kidney Int Suppl* 54, S2-9.
2. Wada T, R. M., Matsushima K, Taguchi T, Yokoyama H, (Ed.) (2004) *Cellular and Molecular Basis, ed Razzaque MS*, Landes Bioscience Eurekah, Washington DC.
3. Risdon, R. A., Sloper, J. C., and De Wardener, H. E. (1968) Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis, *Lancet* 2, 363-366.
4. Nath, K. A. (1998) The tubulointerstitium in progressive renal disease, *Kidney Int* 54, 992-994.
5. Vielhauer, V., Anders, H. J., Mack, M., Cihak, J., Strutz, F., Stangassinger, M., Luckow, B., Grone, H. J., and Schlondorff, D. (2001) Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes, *J Am Soc Nephrol* 12, 1173-1187.
6. Razzaque, M. S., and Taguchi, T. (2002) Cellular and molecular events leading to renal tubulointerstitial fibrosis, *Med Electron Microsc* 35, 68-80.
7. Nangaku, M. (2006) Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure, *J Am Soc Nephrol* 17, 17-25.
8. Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T. M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E. G. (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis, *J Clin Invest* 110, 341-350.
9. Strutz, F., Zeisberg, M., Ziyadeh, F. N., Yang, C. Q., Kalluri, R., Muller, G. A., and Neilson, E. G. (2002) Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation, *Kidney Int* 61, 1714-1728.
10. Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., and Kalluri, R. (2003) BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury, *Nat Med* 9, 964-968.
11. Kitagawa, K., Wada, T., Furuichi, K., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Asano, M., Takeya, M., Kuziel, W. A., Matsushima, K., Mukaida, N., and Yokoyama, H. (2004) Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney, *Am J Pathol* 165, 237-246.
12. Desmouliere, A., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. (2005) Tissue repair, contraction, and the myofibroblast, *Wound Repair Regen* 13, 7-12.
13. El Char, M., Attia, E., Chen, J., Hannafin, J., Poppas, D. P., and Felsen, D. (2005) Cyclooxygenase-2 inhibitor decreases extracellular matrix synthesis in stretched renal fibroblasts, *Nephron Exp Nephrol* 100, e150-155.
14. Wu, M. J., Wen, M. C., Chiu, Y. T., Chiou, Y. Y., Shu, K. H., and Tang, M. J. (2006) Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis, *Kidney Int* 69, 2029-2036.
15. Liu, Y. (2004) Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention, *J Am Soc Nephrol* 15, 1-12.
16. Chevalier, R. L. (1999) Molecular and cellular pathophysiology of obstructive nephropathy, *Pediatr Nephrol* 13, 612-619.
17. Klahr, S. (2001) Urinary tract obstruction, *Semin Nephrol* 21, 133-145.
18. Klahr, S., and Morrissey, J. (2002) Obstructive nephropathy and renal fibrosis, *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F861-875.

19. Kaneto, H., Morrissey, J., and Klahr, S. (1993) Increased expression of TGF-beta 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation, *Kidney Int* 44, 313-321.
20. Satoh, M., Kashihara, N., Yamasaki, Y., Maruyama, K., Okamoto, K., Maeshima, Y., Sugiyama, H., Sugaya, T., Murakami, K., and Makino, H. (2001) Renal interstitial fibrosis is reduced in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice, *J Am Soc Nephrol* 12, 317-325.
21. Rodriguez-Pena, A., Eleno, N., Duwell, A., Arevalo, M., Perez-Barriocanal, F., Flores, O., Docherty, N., Bernabeu, C., Letarte, M., and Lopez-Novoa, J. M. (2002) Endoglin upregulation during experimental renal interstitial fibrosis in mice, *Hypertension* 40, 713-720.
22. Hughes, J., and Johnson, R. J. (1999) Role of Fas (CD95) in tubulointerstitial disease induced by unilateral ureteric obstruction, *Am J Physiol* 277, F26-32.
23. Jones, E. A., Shahed, A., and Shoskes, D. A. (2000) Modulation of apoptotic and inflammatory genes by bioflavonoids and angiotensin II inhibition in ureteral obstruction, *Urology* 56, 346-351.
24. Miyajima, A., Chen, J., Lawrence, C., Ledbetter, S., Soslow, R. A., Stern, J., Jha, S., Pigato, J., Lemer, M. L., Poppas, D. P., Vaughan, E. D., and Felsen, D. (2000) Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction, *Kidney Int* 58, 2301-2313.
25. Bhaskaran, M., Reddy, K., Radhakrishanan, N., Franki, N., Ding, G., and Singhal, P. C. (2003) Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells, *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F955-965.
26. Kaneto, H., Ohtani, H., Fukuzaki, A., Ishidoya, S., Takeda, A., Ogata, Y., Nagura, H., and Orikasa, S. (1999) Increased expression of TGF-beta1 but not of its receptors contributes to human obstructive nephropathy, *Kidney Int* 56, 2137-2146.
27. Morrissey, J. J., and Klahr, S. (1998) Differential effects of ACE and AT1 receptor inhibition on chemoattractant and adhesion molecule synthesis, *Am J Physiol* 274, F580-586.
28. Shappell, S. B., Mendoza, L. H., Gurpinar, T., Smith, C. W., Suki, W. N., and Truong, L. D. (2000) Expression of adhesion molecules in kidney with experimental chronic obstructive uropathy: the pathogenic role of ICAM-1 and VCAM-1, *Nephron* 85, 156-166.
29. Chan, W., Krieg, R. J., Jr., Ward, K., Santos, F., Jr., Lin, K. C., and Chan, J. C. (2001) Progression after release of obstructive nephropathy, *Pediatr Nephrol* 16, 238-244.
30. Yamagishi, H., Yokoo, T., Imasawa, T., Mitarai, T., Kawamura, T., and Utsunomiya, Y. (2001) Genetically modified bone marrow-derived vehicle cells site specifically deliver an anti-inflammatory cytokine to inflamed interstitium of obstructive nephropathy, *J Immunol* 166, 609-616.
31. Chang, C. H., Huang, Y., and Anderson, R. (2003) Activation of vascular endothelial cells by IL-1alpha released by epithelial cells infected with respiratory syncytial virus, *Cell Immunol* 221, 37-41.
32. Diamond, J. R., Kees-Folts, D., Ding, G., Frye, J. E., and Restrepo, N. C. (1994) Macrophages, monocyte chemoattractant peptide-1, and TGF-beta 1 in experimental hydronephrosis, *Am J Physiol* 266, F926-933.
33. Isbel, N. M., Hill, P. A., Foti, R., Mu, W., Hurst, L. A., Stambe, C., Lan, H. Y., Atkins, R. C., and Nikolic-Paterson, D. J. (2001) Tubules are the major site of M-CSF production in experimental kidney disease: correlation with local macrophage proliferation, *Kidney Int* 60, 614-625.
34. Dedon, P. C., and Tannenbaum, S. R. (2004) Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation, *Arch Biochem Biophys* 423, 12-22.
35. Schreiner, G. F., Harris, K. P., Purkerson, M. L., and Klahr, S. (1988) Immunological aspects of acute ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the kidney, *Kidney Int* 34, 487-493.

36. Hsu, C. H., Kurtz, T. W., Rosenzweig, J., and Weller, J. M. (1977) Intrarenal hemodynamics and ureteral pressure during ureteral obstruction, *Invest Urol* 14, 442-445.
37. Miyajima, A., Chen, J., Poppas, D. P., Vaughan, E. D., Jr., and Felsen, D. (2001) Role of nitric oxide in renal tubular apoptosis of unilateral ureteral obstruction, *Kidney Int* 59, 1290-1303.
38. Manucha, W., Oliveros, L., Carrizo, L., Seltzer, A., and Valles, P. (2004) Losartan modulation on NOS isoforms and COX-2 expression in early renal fibrogenesis in unilateral obstruction, *Kidney Int* 65, 2091-2107.
39. Welch, W. J., Wilcox, C. S., and Thomson, S. C. (1999) Nitric oxide and tubuloglomerular feedback, *Semin Nephrol* 19, 251-262.
40. Naber, K. G., and Madsen, P. O. (1974) Renal function in chronic hydronephrosis with and without infection and the role of the lymphatics. An experimental study in dogs, *Urol Res* 2, 1-9.
41. Moody, T. E., Vaughn, E. D., Jr., and Gillenwater, J. Y. (1975) Relationship between renal blood flow and ureteral pressure during 18 hours of total unilateral urethral occlusion. Implications for changing sites of increased renal resistance, *Invest Urol* 13, 246-251.
42. Ricardo, S. D., Ding, G., Eufemio, M., and Diamond, J. R. (1997) Antioxidant expression in experimental hydronephrosis: role of mechanical stretch and growth factors, *Am J Physiol* 272, F789-798.
43. Power, R. E., Doyle, B. T., Higgins, D., Brady, H. R., Fitzpatrick, J. M., and Watson, R. W. (2004) Mechanical deformation induced apoptosis in human proximal renal tubular epithelial cells is caspase dependent, *J Urol* 171, 457-461.
44. Geiser, T., Ishigaki, M., van Leer, C., Matthay, M. A., and Broaddus, V. C. (2004) H₂O₂ inhibits alveolar epithelial wound repair in vitro by induction of apoptosis, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L448-453.
45. Khan, S., Cleveland, R. P., Koch, C. J., and Schelling, J. R. (1999) Hypoxia induces renal tubular epithelial cell apoptosis in chronic renal disease, *Lab Invest* 79, 1089-1099.
46. Hotter, G., Palacios, L., and Sola, A. (2004) Low O₂ and high CO₂ in LLC-PK1 cells culture mimics renal ischemia-induced apoptosis, *Lab Invest* 84, 213-220.
47. Yang, J., Shultz, R. W., Mars, W. M., Wegner, R. E., Li, Y., Dai, C., Nejak, K., and Liu, Y. (2002) Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy, *J Clin Invest* 110, 1525-1538.
48. Cai, G., Zhang, X., Hong, Q., Shao, F., Shang, X., Fu, B., Feng, Z., Lin, H., Wang, J., Shi, S., Yin, Z., and Chen, X. (2008) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 exacerbated renal interstitial fibrosis through enhancing inflammation, *Nephrol Dial Transplant* 23, 1861-1875.
49. Surendran, K., Simon, T. C., Liapis, H., and McGuire, J. K. (2004) Matrilysin (MMP-7) expression in renal tubular damage: association with Wnt4, *Kidney Int* 65, 2212-2222.
50. Nishida, M., Okumura, Y., Ozawa, S., Shiraishi, I., Itoi, T., and Hamaoka, K. (2007) MMP-2 inhibition reduces renal macrophage infiltration with increased fibrosis in UUO, *Biochem Biophys Res Commun* 354, 133-139.
51. Strutz, F., and Zeisberg, M. (2006) Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease, *J Am Soc Nephrol* 17, 2992-2998.
52. Qi, W., Chen, X., Poronnik, P., and Pollock, C. A. (2006) The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis, *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1-5.
53. Strutz, F. (2008) How many different roads may a cell walk down in order to become a fibroblast?, *J Am Soc Nephrol* 19, 2246-2248.
54. Picard, N., Baum, O., Vogetseder, A., Kaissling, B., and Le Hir, M. (2008) Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat, *Histochem Cell Biol* 130, 141-155.

55. Lin, S. L., Kisseleva, T., Brenner, D. A., and Duffield, J. S. (2008) Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney, *Am J Pathol* 173, 1617-1627.
56. Zeisberg, E. M., Potenta, S. E., Sugimoto, H., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2008) Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition, *J Am Soc Nephrol* 19, 2282-2287.
57. Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2008) Fibroblasts emerge via epithelial-mesenchymal transition in chronic kidney fibrosis, *Front Biosci* 13, 6991-6998.
58. Yamashita, S., Maeshima, A., and Nojima, Y. (2005) Involvement of renal progenitor tubular cells in epithelial-to-mesenchymal transition in fibrotic rat kidneys, *J Am Soc Nephrol* 16, 2044-2051.
59. Roufosse, C., Bou-Gharios, G., Prodromidi, E., Alexakis, C., Jeffery, R., Khan, S., Otto, W. R., Alter, J., Poulosom, R., and Cook, H. T. (2006) Bone marrow-derived cells do not contribute significantly to collagen I synthesis in a murine model of renal fibrosis, *J Am Soc Nephrol* 17, 775-782.
60. Lee, D. B., Huang, E., and Ward, H. J. (2006) Tight junction biology and kidney dysfunction, *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F20-34.
61. Falanga, V., Qian, S. W., Danielpour, D., Katz, M. H., Roberts, A. B., and Sporn, M. B. (1991) Hypoxia upregulates the synthesis of TGF-beta 1 by human dermal fibroblasts, *J Invest Dermatol* 97, 634-637.
62. Santilli, S. M., Fiegel, V. D., Aldridge, D. E., and Knighton, D. R. (1991) Rabbit aortic endothelial cell hypoxia induces secretion of transforming growth factor beta and augments macrophage adhesion in vitro, *Ann Vasc Surg* 5, 429-438.
63. Khaliq, A., Patel, B., Jarvis-Evans, J., Moriarty, P., McLeod, D., and Boulton, M. (1995) Oxygen modulates production of bFGF and TGF-beta by retinal cells in vitro, *Exp Eye Res* 60, 415-423.
64. Okada, H., Danoff, T. M., Kalluri, R., and Neilson, E. G. (1997) Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation, *Am J Physiol* 273, F563-574.
65. Le Hir, M., Hegyi, I., Cueni-Loffing, D., Loffing, J., and Kaissling, B. (2005) Characterization of renal interstitial fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells in healthy and inflamed rodent kidneys, *Histochem Cell Biol* 123, 335-346.
66. Henderson, N. C., and Sethi, T. (2009) The regulation of inflammation by galectin-3, *Immunol Rev* 230, 160-171.
67. Henderson, N. C., Mackinnon, A. C., Farnworth, S. L., Kipari, T., Haslett, C., Iredale, J. P., Liu, F. T., Hughes, J., and Sethi, T. (2008) Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis, *Am J Pathol* 172, 288-298.
68. Lin, S. L., Castano, A. P., Nowlin, B. T., Lupher, M. L., Jr., and Duffield, J. S. (2009) Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations, *J Immunol* 183, 6733-6743.
69. Macconi, D., Chiabrando, C., Schiarea, S., Aiello, S., Cassis, L., Gagliardini, E., Noris, M., Buelli, S., Zoja, C., Corna, D., Mele, C., Fanelli, R., Remuzzi, G., and Benigni, A. (2009) Proteasomal processing of albumin by renal dendritic cells generates antigenic peptides, *J Am Soc Nephrol* 20, 123-130.
70. Heymann, F., Meyer-Schwesinger, C., Hamilton-Williams, E. E., Hammerich, L., Panzer, U., Kaden, S., Quaggin, S. E., Floege, J., Grone, H. J., and Kurts, C. (2009) Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury, *J Clin Invest* 119, 1286-1297.
71. Sakamoto, I., Ito, Y., Mizuno, M., Suzuki, Y., Sawai, A., Tanaka, A., Maruyama, S., Takei, Y., Yuzawa, Y., and Matsuo, S. (2009) Lymphatic vessels develop during tubulointerstitial fibrosis, *Kidney Int* 75, 828-838.

72. Kerjaschki, D., Regele, H. M., Moosberger, I., Nagy-Bojarski, K., Watschinger, B., Soleiman, A., Birner, P., Krieger, S., Hovorka, A., Silberhumer, G., Laakkonen, P., Petrova, T., Langer, B., and Raab, I. (2004) Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates, *J Am Soc Nephrol* 15, 603-612.
73. Stucht, S., Gwinner, W., Franz, I., Schwarz, A., Jonigk, D., Kreipe, H., Kerjaschki, D., Haller, H., and Mengel, M. (2007) Lymphatic neoangiogenesis in human renal allografts: results from sequential protocol biopsies, *Am J Transplant* 7, 377-384.
74. Matsui, K., Nagy-Bojarsky, K., Laakkonen, P., Krieger, S., Mechtler, K., Uchida, S., Geleff, S., Kang, D. H., Johnson, R. J., and Kerjaschki, D. (2003) Lymphatic microvessels in the rat remnant kidney model of renal fibrosis: aminopeptidase p and podoplanin are discriminatory markers for endothelial cells of blood and lymphatic vessels, *J Am Soc Nephrol* 14, 1981-1989.
75. Holdsworth, S. R., and Summers, S. A. (2008) Role of mast cells in progressive renal diseases, *J Am Soc Nephrol* 19, 2254-2261.
76. El-Koraie, A. F., Baddour, N. M., Adam, A. G., El Kashef, E. H., and El Nahas, A. M. (2001) Role of stem cell factor and mast cells in the progression of chronic glomerulonephritides, *Kidney Int* 60, 167-172.
77. Roberts, I. S., and Brenchley, P. E. (2000) Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis, *J Clin Pathol* 53, 858-862.
78. Kim, D. H., Moon, S. O., Jung, Y. J., Lee, A. S., Kang, K. P., Lee, T. H., Lee, S., Chai, O. H., Song, C. H., Jang, K. Y., Sung, M. J., Zhang, X., Park, S. K., and Kim, W. (2009) Mast cells decrease renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction, *Kidney Int* 75, 1031-1038.
79. Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity, *Immunity* 12, 121-127.
80. Eis, V., Luckow, B., Vielhauer, V., Siveke, J. T., Linde, Y., Segerer, S., Perez De Lema, G., Cohen, C. D., Kretzler, M., Mack, M., Horuk, R., Murphy, P. M., Gao, J. L., Hudkins, K. L., Alpers, C. E., Grone, H. J., Schlondorff, D., and Anders, H. J. (2004) Chemokine receptor CCR1 but not CCR5 mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction, *J Am Soc Nephrol* 15, 337-347.
81. Shappell, S. B., Gurpinar, T., Lechago, J., Suki, W. N., and Truong, L. D. (1998) Chronic obstructive uropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice: lymphocyte infiltration is not required for progressive tubulointerstitial injury, *J Am Soc Nephrol* 9, 1008-1017.
82. Niedermeier, M., Reich, B., Rodriguez Gomez, M., Denzel, A., Schmidbauer, K., Gobel, N., Talke, Y., Schweda, F., and Mack, M. (2009) CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17892-17897.
83. Tapmeier, T. T., Fearn, A., Brown, K., Chowdhury, P., Sacks, S. H., Sheerin, N. S., and Wong, W. (2010) Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction, *Kidney Int* 78, 351-362.
84. Eitner, F., Bucher, E., van Roeyen, C., Kunter, U., Rong, S., Seikrit, C., Villa, L., Boor, P., Fredriksson, L., Backstrom, G., Eriksson, U., Ostman, A., Floege, J., and Ostendorf, T. (2008) PDGF-C is a proinflammatory cytokine that mediates renal interstitial fibrosis, *J Am Soc Nephrol* 19, 281-289.
85. Strutz, F., Zeisberg, M., Hemmerlein, B., Sattler, B., Hummel, K., Becker, V., and Muller, G. A. (2000) Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation, *Kidney Int* 57, 1521-1538.
86. Hinz, B. (2006) Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission, *Eur J Cell Biol* 85, 175-181.

87. Lange-Sperandio, B., Trautmann, A., Eickelberg, O., Jayachandran, A., Oberle, S., Schmidutz, F., Rodenbeck, B., Homme, M., Horuk, R., and Schaefer, F. (2007) Leukocytes induce epithelial to mesenchymal transition after unilateral ureteral obstruction in neonatal mice, *Am J Pathol* 171, 861-871.
88. Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A. B., and Ooshima, A. (2003) Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction, *J Clin Invest* 112, 1486-1494.
89. Demirbilek, S., Emre, M. H., Aydin, E. N., Edali, M. N., Aksoy, R. T., Akin, M., Gurunluoglu, K., Tas, E., Ay, S., and Yilmaz, Z. (2007) Sulfasalazine reduces inflammatory renal injury in unilateral ureteral obstruction, *Pediatr Nephrol* 22, 804-812.
90. Ricardo, S. D., Levinson, M. E., DeJoseph, M. R., and Diamond, J. R. (1996) Expression of adhesion molecules in rat renal cortex during experimental hydronephrosis, *Kidney Int* 50, 2002-2010.
91. Cheng, Q. L., Chen, X. M., Li, F., Lin, H. L., Ye, Y. Z., and Fu, B. (2000) Effects of ICAM-1 antisense oligonucleotide on the tubulointerstitium in mice with unilateral ureteral obstruction, *Kidney Int* 57, 183-190.
92. Cotran, R. S., and Pober, J. S. (1989) Effects of cytokines on vascular endothelium: their role in vascular and immune injury, *Kidney Int* 35, 969-975.
93. Border, W. A., and Noble, N. A. (1993) Cytokines in kidney disease: the role of transforming growth factor-beta, *Am J Kidney Dis* 22, 105-113.
94. Branton, M. H., and Kopp, J. B. (1999) TGF-beta and fibrosis, *Microbes Infect* 1, 1349-1365.
95. Phillips, A. O., Topley, N., Morrissey, K., Williams, J. D., and Steadman, R. (1997) Basic fibroblast growth factor stimulates the release of preformed transforming growth factor beta 1 from human proximal tubular cells in the absence of de novo gene transcription or mRNA translation, *Lab Invest* 76, 591-600.
96. Jones, S. G., Morrissey, K., Williams, J. D., and Phillips, A. O. (1999) TGF-beta1 stimulates the release of pre-formed bFGF from renal proximal tubular cells, *Kidney Int* 56, 83-91.
97. Dai, C., Yang, J., and Liu, Y. (2003) Transforming growth factor-beta1 potentiates renal tubular epithelial cell death by a mechanism independent of Smad signaling, *J Biol Chem* 278, 12537-12545.
98. Burger, A., Wagner, C., Viedt, C., Reis, B., Hug, F., and Hansch, G. M. (1998) Fibronectin synthesis by human tubular epithelial cells in culture: effects of PDGF and TGF-beta on synthesis and splicing, *Kidney Int* 54, 407-415.
99. Schnaper, H. W., Hayashida, T., Hubchak, S. C., and Poncelet, A. C. (2003) TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis, *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F243-252.
100. Gore-Hyer, E., Shegogue, D., Markiewicz, M., Lo, S., Hazen-Martin, D., Greene, E. L., Grotendorst, G., and Trojanowska, M. (2002) TGF-beta and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells, *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F707-716.
101. Han, Y. P., Tuan, T. L., Hughes, M., Wu, H., and Garner, W. L. (2001) Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin, *J Biol Chem* 276, 22341-22350.
102. Leivonen, S. K., Chantry, A., Hakkinen, L., Han, J., and Kahari, V. M. (2002) Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways, *J Biol Chem* 277, 46338-46346.
103. Basile, D. P., Martin, D. R., and Hammerman, M. R. (1998) Extracellular matrix-related genes in kidney after ischemic injury: potential role for TGF-beta in repair, *Am J Physiol* 275, F894-903.

104. Igotz, R. A., Heino, J., and Massague, J. (1989) Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Regulation of vitronectin receptor and LFA-1, *J Biol Chem* 264, 389-392.
105. Kondo, S., Kagami, S., Urushihara, M., Kitamura, A., Shimizu, M., Strutz, F., Muller, G. A., and Kuroda, Y. (2004) Transforming growth factor-beta1 stimulates collagen matrix remodeling through increased adhesive and contractive potential by human renal fibroblasts, *Biochim Biophys Acta* 1693, 91-100.
106. Wrana, J. L. (1998) TGF-beta receptors and signalling mechanisms, *Miner Electrolyte Metab* 24, 120-130.
107. ten Dijke, P., and Hill, C. S. (2004) New insights into TGF-beta-Smad signalling, *Trends Biochem Sci* 29, 265-273.
108. Misseri, R., Meldrum, D. R., Dinarello, C. A., Dagher, P., Hile, K. L., Rink, R. C., and Meldrum, K. K. (2005) TNF-alpha mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling, *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F406-411.
109. Guo, G., Morrissey, J., McCracken, R., Tolley, T., and Klahr, S. (1999) Role of TNFR1 and TNFR2 receptors in tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy, *Am J Physiol* 277, F766-772.
110. Gao, X., Mae, H., Ayabe, N., Takai, T., Oshima, K., Hattori, M., Ueki, T., Fujimoto, J., and Tanizawa, T. (2002) Hepatocyte growth factor gene therapy retards the progression of chronic obstructive nephropathy, *Kidney Int* 62, 1238-1248.
111. Simon, M., Maresh, J. G., Harris, S. E., Hernandez, J. D., Arar, M., Olson, M. S., and Abboud, H. E. (1999) Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney, *Am J Physiol* 276, F382-389.
112. Wang, S. N., Lapage, J., and Hirschberg, R. (2001) Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy, *J Am Soc Nephrol* 12, 2392-2399.
113. Hruska, K. A., Guo, G., Wozniak, M., Martin, D., Miller, S., Liapis, H., Loveday, K., Klahr, S., Sampath, T. K., and Morrissey, J. (2000) Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction, *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F130-143.
114. Morrissey, J., Hruska, K., Guo, G., Wang, S., Chen, Q., and Klahr, S. (2002) Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function, *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 1, S14-21.
115. Roberts, R. A., James, N. H., and Cosulich, S. C. (2000) The role of protein kinase B and mitogen-activated protein kinase in epidermal growth factor and tumor necrosis factor alpha-mediated rat hepatocyte survival and apoptosis, *Hepatology* 31, 420-427.
116. Storch, S., Saggi, S., Megyesi, J., Price, P. M., and Safirstein, R. (1992) Ureteral obstruction decreases renal prepro-epidermal growth factor and Tamm-Horsfall expression, *Kidney Int* 42, 89-94.
117. Kennedy, W. A., 2nd, Buttyan, R., Garcia-Montes, E., D'Agati, V., Olsson, C. A., and Sawczuk, I. S. (1997) Epidermal growth factor suppresses renal tubular apoptosis following ureteral obstruction, *Urology* 49, 973-980.
118. Chevalier, R. L., Goyal, S., Wolstenholme, J. T., and Thornhill, B. A. (1998) Obstructive nephropathy in the neonatal rat is attenuated by epidermal growth factor, *Kidney Int* 54, 38-47.
119. Diamond, J. R., Kees-Folts, D., Ricardo, S. D., Pruznak, A., and Eufemio, M. (1995) Early and persistent up-regulated expression of renal cortical osteopontin in experimental hydronephrosis, *Am J Pathol* 146, 1455-1466.
120. Diamond, J. R., Kreisberg, R., Evans, R., Nguyen, T. A., and Ricardo, S. D. (1998) Regulation of proximal tubular osteopontin in experimental hydronephrosis in the rat, *Kidney Int* 54, 1501-1509.

121. Kaneto, H., Morrissey, J., McCracken, R., Reyes, A., and Klahr, S. (1998) Osteopontin expression in the kidney during unilateral ureteral obstruction, *Miner Electrolyte Metab* 24, 227-237.
122. Ophascharoensuk, V., Giachelli, C. M., Gordon, K., Hughes, J., Pichler, R., Brown, P., Liaw, L., Schmidt, R., Shankland, S. J., Alpers, C. E., Couser, W. G., and Johnson, R. J. (1999) Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis, *Kidney Int* 56, 571-580.
123. Kawada, N., Moriyama, T., Ando, A., Fukunaga, M., Miyata, T., Kurokawa, K., Imai, E., and Hori, M. (1999) Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction, *Kidney Int* 56, 1004-1013.
124. Sunami, R., Sugiyama, H., Wang, D. H., Kobayashi, M., Maeshima, Y., Yamasaki, Y., Masuoka, N., Ogawa, N., Kira, S., and Makino, H. (2004) Acatlasemia sensitizes renal tubular epithelial cells to apoptosis and exacerbates renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction, *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F1030-1038.
125. Kuemmerle, N. B., Brandt, R. B., Chan, W., Krieg, R. J., Jr., and Chan, J. C. (1997) Inhibition of transforming growth factor beta 1 induction by dietary vitamin E in unilateral ureteral obstruction in rats, *Biochem Mol Med* 61, 82-86.
126. Saborio, P., Krieg, R. J., Jr., Kuemmerle, N. B., Norkus, E. P., Schwartz, C. C., and Chan, J. C. (2000) Alpha-tocopherol modulates lipoprotein cytotoxicity in obstructive nephropathy, *Pediatr Nephrol* 14, 740-746.
127. Moriyama, T., Kawada, N., Nagatoya, K., Takeji, M., Horio, M., Ando, A., Imai, E., and Hori, M. (2001) Fluvastatin suppresses oxidative stress and fibrosis in the interstitium of mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction, *Kidney Int* 59, 2095-2103.
128. Sugiyama, H., Kobayashi, M., Wang, D. H., Sunami, R., Maeshima, Y., Yamasaki, Y., Masuoka, N., Kira, S., and Makino, H. (2005) Telmisartan inhibits both oxidative stress and renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction in acatalasemic mice, *Nephrol Dial Transplant* 20, 2670-2680.
129. O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H., Tsui, L. C., Kennedy, J. L., Shi, X., Petronis, A., George, S. R., and Nguyen, T. (1993) A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11, *Gene* 136, 355-360.
130. Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M. X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., and Fujino, M. (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 251, 471-476.
131. Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Murosaki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Tatemoto, K., and Fujino, M. (1999) Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum, *Biochim Biophys Acta* 1452, 25-35.
132. Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2000) Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin, *J Biol Chem* 275, 21061-21067.
133. Reaux, A., De Mota, N., Skultetyova, I., Lenkei, Z., El Messari, S., Gallatz, K., Corvol, P., Palkovits, M., and Llorens-Cortes, C. (2001) Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain, *J Neurochem* 77, 1085-1096.
134. Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2001) Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding, *Biochim Biophys Acta* 1538, 162-171.

135. Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M. X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., and Fujimiya, M. (2001) The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism, *Regul Pept* 99, 87-92.
136. Lee, D. K., Saldivia, V. R., Nguyen, T., Cheng, R., George, S. R., and O'Dowd, B. F. (2005) Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action, *Endocrinology* 146, 231-236.
137. Szokodi, I., Tavi, P., Foldes, G., Voutilainen-Myllyla, S., Ilves, M., Tokola, H., Pikkarainen, S., Piuhola, J., Rysa, J., Toth, M., and Ruskoaho, H. (2002) Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility, *Circ Res* 91, 434-440.
138. Ronkainen, V. P., Ronkainen, J. J., Hanninen, S. L., Leskinen, H., Ruas, J. L., Pereira, T., Poellinger, L., Vuolteenaho, O., and Tavi, P. (2007) Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin, *FASEB J* 21, 1821-1830.
139. Masri, B., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2005) Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology, *Cell Signal* 17, 415-426.
140. Lee, D. K., Lanca, A. J., Cheng, R., Nguyen, T., Ji, X. D., Gobeil, F., Jr., Chemtob, S., George, S. R., and O'Dowd, B. F. (2004) Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors, *J Biol Chem* 279, 7901-7908.
141. Drews, J. (2000) Drug discovery: a historical perspective, *Science* 287, 1960-1964.
142. Neves, S. R., Ram, P. T., and Iyengar, R. (2002) G protein pathways, *Science* 296, 1636-1639.
143. Bai, B., Tang, J., Liu, H., Chen, J., Li, Y., and Song, W. (2008) Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activation through coupling of the human apelin receptor to the Gi2 pathway, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 311-318.
144. Masri, B., Morin, N., Cornu, M., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2004) Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells, *FASEB J* 18, 1909-1911.
145. Lee, D. K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A. P., Liu, Y., Osmond, D. H., George, S. R., and O'Dowd, B. F. (2000) Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor, *J Neurochem* 74, 34-41.
146. O'Carroll, A. M., Selby, T. L., Palkovits, M., and Lolait, S. J. (2000) Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues, *Biochim Biophys Acta* 1492, 72-80.
147. Brailoiu, G. C., Dun, S. L., Yang, J., Ohsawa, M., Chang, J. K., and Dun, N. J. (2002) Apelin-immunoreactivity in the rat hypothalamus and pituitary, *Neurosci Lett* 327, 193-197.
148. Kleinz, M. J., and Davenport, A. P. (2004) Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells, *Regul Pept* 118, 119-125.
149. Hus-Citharel, A., Bouby, N., Frugiere, A., Bodineau, L., Gasc, J. M., and Llorens-Cortes, C. (2008) Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney, *Kidney Int* 74, 486-494.
150. Reaux, A., Gallatz, K., Palkovits, M., and Llorens-Cortes, C. (2002) Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain, *Neuroscience* 113, 653-662.
151. Reaux-Le Goazigo, A., Morinville, A., Burlet, A., Llorens-Cortes, C., and Beaudet, A. (2004) Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons, *Endocrinology* 145, 4392-4400.
152. De Mota, N., Reaux-Le Goazigo, A., El Messari, S., Chartrel, N., Roesch, D., Dujardin, C., Kordon, C., Vaudry, H., Moos, F., and Llorens-Cortes, C. (2004) Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10464-10469.

153. De Falco, M., De Luca, L., Onori, N., Cavallotti, I., Artigiano, F., Esposito, V., De Luca, B., Laforgia, V., Groeger, A. M., and De Luca, A. (2002) Apelin expression in normal human tissues, *In Vivo* 16, 333-336.
154. Ladeiras-Lopes, R., Ferreira-Martins, J., and Leite-Moreira, A. F. (2008) The apelinergic system: the role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications, *Arq Bras Cardiol* 90, 343-349.
155. Pchejetski, D., Foussal, C., Alfarano, C., Lairez, O., Calise, D., Guilbeau-Frugier, C., Schaak, S., Seguelas, M. H., Wanecq, E., Valet, P., Parini, A., and Kunduzova, O. (2012) Apelin prevents cardiac fibroblast activation and collagen production through inhibition of sphingosine kinase 1, *Eur Heart J* 33, 2360-2369.
156. Leeper, N. J., Tedesco, M. M., Kojima, Y., Schultz, G. M., Kundu, R. K., Ashley, E. A., Tsao, P. S., Dalman, R. L., and Quertermous, T. (2009) Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H1329-1335.
157. Melgar-Lesmes, P., Casals, G., Pauta, M., Ros, J., Reichenbach, V., Bataller, R., Morales-Ruiz, M., and Jimenez, W. (2010) Apelin mediates the induction of profibrogenic genes in human hepatic stellate cells, *Endocrinology* 151, 5306-5314.
158. Reichenbach, V., Ros, J., Fernandez-Varo, G., Casals, G., Melgar-Lesmes, P., Campos, T., Makriyannis, A., Morales-Ruiz, M., and Jimenez, W. (2012) Prevention of fibrosis progression in CCl4-treated rats: role of the hepatic endocannabinoid and apelin systems, *J Pharmacol Exp Ther* 340, 629-637.
159. Chun, H. J., Ali, Z. A., Kojima, Y., Kundu, R. K., Sheikh, A. Y., Agrawal, R., Zheng, L., Leeper, N. J., Pearl, N. E., Patterson, A. J., Anderson, J. P., Tsao, P. S., Lenardo, M. J., Ashley, E. A., and Quertermous, T. (2008) Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis, *J Clin Invest* 118, 3343-3354.
160. Wu, W. P., Chang, C. H., Chiu, Y. T., Ku, C. L., Wen, M. C., Shu, K. H., and Wu, M. J. (2010) A reduction of unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by a therapy combining valsartan with aliskiren, *Am J Physiol Renal Physiol* 299, F929-941.
161. Tugtepe, H., Sener, G., Biyikli, N. K., Yuksel, M., Cetinel, S., Gedik, N., and Yegen, B. C. (2007) The protective effect of oxytocin on renal ischemia/reperfusion injury in rats, *Regul Pept* 140, 101-108.
162. Ascon, D. B., Lopez-Briones, S., Liu, M., Ascon, M., Savransky, V., Colvin, R. B., Soloski, M. J., and Rabb, H. (2006) Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury, *J Immunol* 177, 3380-3387.
163. Rouschop, K. M., Sewnath, M. E., Claessen, N., Roelofs, J. J., Hoedemaeker, I., van der Neut, R., Aten, J., Pals, S. T., Weening, J. J., and Florquin, S. (2004) CD44 deficiency increases tubular damage but reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy, *J Am Soc Nephrol* 15, 674-686.
164. Badid, C., Desmouliere, A., Babici, D., Hadj-Aissa, A., McGregor, B., Lefrancois, N., Touraine, J. L., and Laville, M. (2002) Interstitial expression of alpha-SMA: an early marker of chronic renal allograft dysfunction, *Nephrol Dial Transplant* 17, 1993-1998.
165. Chatterjee, P. K., Zacharowski, K., Cuzzocrea, S., Brown, P. A., Stewart, K. N., Mota-Filipe, H., and Thiemermann, C. (2002) Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* reduces renal ischemia/reperfusion injury, *Kidney Int* 62, 1249-1263.
166. Geleilate, T. J., Costa, R. S., Dantas, M., and Coimbra, T. M. (2001) Alpha-smooth muscle actin and proliferating cell nuclear antigen expression in focal segmental glomerulosclerosis: functional and structural parameters of renal disease progression, *Braz J Med Biol Res* 34, 985-991.
167. Miyaji, T., Kato, A., Yasuda, H., Fujigaki, Y., and Hishida, A. (2001) Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats, *J Am Soc Nephrol* 12, 900-908.

168. Romanque, U. P., Uribe, M. M., and Videla, L. A. (2005) [Molecular mechanisms in liver ischemic-reperfusion injury and ischemic preconditioning], *Rev Med Chil* 133, 469-476.
169. Cvetkovic, T., Vlahovic, P., Pavlovic, D., Kocic, G., Jevtovic, T., and Djordjevic, V. B. (1998) Low catalase activity in rats with ureteral ligation: relation to lipid peroxidation, *Exp Nephrol* 6, 74-77.
170. Zeng, X. J., Zhang, L. K., Wang, H. X., Lu, L. Q., Ma, L. Q., and Tang, C. S. (2009) Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat, *Peptides* 30, 1144-1152.
171. Day, R. T., Cavaglieri, R. C., and Feliers, D. (2013) Apelin retards the progression of diabetic nephropathy, *Am J Physiol Renal Physiol* 304, F788-800.
172. El-Shehaby, A. M., El-Khatib, M. M., Battah, A. A., and Roshdy, A. R. (2010) Apelin: a potential link between inflammation and cardiovascular disease in end stage renal disease patients, *Scand J Clin Lab Invest* 70, 421-427.
173. Shah, P. K. (1997) Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis: an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm, *Circulation* 96, 2115-2117.
174. Sho, E., Sho, M., Hoshina, K., Kimura, H., Nakahashi, T. K., and Dalman, R. L. (2004) Hemodynamic forces regulate mural macrophage infiltration in experimental aortic aneurysms, *Exp Mol Pathol* 76, 108-116.
175. Truong, L. D., Petrusavska, G., Yang, G., Gurpinar, T., Shappell, S., Lechago, J., Rouse, D., and Suki, W. N. (1996) Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy, *Kidney Int* 50, 200-207.
176. Tao, J., Zhu, W., Li, Y., Xin, P., Li, J., Liu, M., Redington, A. N., and Wei, M. (2011) Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of ER-dependent apoptotic pathways in a time-dependent fashion, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H1471-1486.
177. Guo, G., Morrissey, J., McCracken, R., Tolley, T., Liapis, H., and Klahr, S. (2001) Contributions of angiotensin II and tumor necrosis factor-alpha to the development of renal fibrosis, *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F777-785.
178. Grande, M. T., and Lopez-Novoa, J. M. (2009) Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy, *Nat Rev Nephrol* 5, 319-328.
179. Garin, G., Badid, C., McGregor, B., Vincent, M., Guerret, S., Zibara, K., Hurlstone, A., Laville, M., and McGregor, J. L. (2003) Ischemia induces early expression of a new transcription factor (6A3-5) in kidney vascular smooth muscle cells: studies in rat and human renal pathology, *Am J Pathol* 163, 2485-2494.
180. Takeji, M., Moriyama, T., Oseto, S., Kawada, N., Hori, M., Imai, E., and Miwa, T. (2006) Smooth muscle alpha-actin deficiency in myofibroblasts leads to enhanced renal tissue fibrosis, *J Biol Chem* 281, 40193-40200.
181. Nishida, M., Okumura, Y., Oka, T., Toiyama, K., Ozawa, S., Itoi, T., and Hamaoka, K. (2012) The role of apelin on the alleviative effect of Angiotensin receptor blocker in unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis, *Nephron Extra* 2, 39-47.
182. Siddiquee, K., Hampton, J., Khan, S., Zadory, D., Gleaves, L., Vaughan, D. E., and Smith, L. H. (2011) Apelin protects against angiotensin II-induced cardiovascular fibrosis and decreases plasminogen activator inhibitor type-1 production, *J Hypertens* 29, 724-731.



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	28.2012.mcs
	PROJE ADI	Tek Taraflı Obstrüksiyon Modelinde Böbrek Apelin ve Apelin Antagonistlerinin Fibrozis Üzerine Olası Koruyucu Etkileri
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof.Dr. Mehmet KOÇ
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	M.Ü Tıp Fak. Fizyoloji BD
	DESTEKLEYİCİ	TÜBİTAK-BAPKO

KARAR BİLGİLERİ	Karar No :	Tarih: 29.02.2012
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımlar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.

ÜYELER					
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeligi	Onaylanan Proje ile ilişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof. Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü	<input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. İnci ALICAN	Fizyoloji	Yürütücü Sekreteri	<input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof. Dr. Aysen YARAT	Biyokimya	M.Ü Dış Hekimliği Fakültesi	<input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Doç.Dr. Hasan Raci YANANLI	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Doç. Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji-Embriyoloji	M.Ü Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Öğr. Gör.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veterineri	<input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	ARAŞTIRICI
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	İstanbul Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	<input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Billur AYGÖR	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	<input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	