

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



TACROLİMUS NEFROTOKSİSİTESİ GELİŞTİRİLMİŞ
HAYVAN MODELİNDE
FİBROJENİK SİTOKİNLERİN PATOGENETİK ROLÜ VE
ACE İNHİBİTÖRÜ VE AII RESEPTÖR BLOKERİNİN BUNA ETKİSİ

İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi
Dr. Hicran Deniz

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Serhan Tuğlular

İSTANBUL-2005

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları eğitimim boyunca bilimsel ve kişisel açıdan yetişmemde emekleri olan bütün hocalarıma ve özellikle tez çalışmam boyunca yol gösterici olan Prof. Dr. Emel Akoğlu'na ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübeleri ile bana destek olan Doç. Dr. Serhan Tuğlular'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın yürütülmesinde yardımcı olan Doç. Dr. Fulya Çakalağaoğlu'na, Dr. Betül Öđütmen'e, Dr. Beyza Macunluoğlu'na, Marmara Üniversitesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına, manevi desteklerini esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma ve aileme çok teşekkür ederim.

Dr. Hicran Deniz
Mart 2005

ÖZET

Tacrolimus otoimmün hastalıklarda ve organ transplantasyonunda kullanılan immünsupresif bir ilaçtır. Bu ilacın uzun dönem kullanılması sonrasında ortaya çıkan nefrotoksisite, ilacın kullanımını kısıtlayan en önemli faktördür.

Çalışmamızın amacı, kronik Tacrolimus nefrotoksisitesinde böbrekte gelişen işlevsel ve yapısal hasarın patogenezinde TGF- β , PDGF, VEGF, IL-6 ekspresyonu ve antifibrotik özellikli bir sitokin olan BMP-7 ekspresyonu ile ACE inhibitörü ve Ang II reseptör blokeri tedavisinin, bu sitokinler ve renal hasar üzerine etkisini araştırmaktır.

Çalışmamızın verilerine göre şıçanlara kronik Tacrolimus uygulaması sonrasında, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, fonksiyonel parametreler üzerinde anlamlı fark tespit edilmemiş olmakla birlikte, patolojik bulgularda Tacrolimus uygulanan şıçanlarda yapısal değişiklikler gelişmiş, çalışma grubunda sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TGF- β , PDGF, IL-6, VEGF ekspresyonunda belirgin artış ve BMP-7 ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Tacrolimus'a ek olarak RAS blokajı uygulanan (Kinapril ve Valsartan ile) şıçanlarla, sadece Tacrolimus alan grup karşılaştırıldığında, RAS blokajı uygulanan grupta, TGF- β , PDGF, IL-6, VEGF ekspresyonlarında belirgin olarak azalma saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışma sonucundaki bulgularımız Tacrolimus nefrotoksisitesinde fibrojenik sitokin ekspresyonunda belirgin artış meydana geldiğini ve RAS blokajının fibrojenik sitokin ekspresyonunu azalttığını göstermektedir.

SUMMARY

Tacrolimus (Tac) is an immunosuppressive drug used for the treatment of autoimmune diseases and after organ transplantations. The major side effect of this immunosuppressive agent is chronic nephrotoxicity, which limits its long term use.

The aim of our study is to evaluate the role of TGF- β , PDGF, VEGF, IL-6 and BMP-7 expression in the pathogenesis of functional and structural injury secondary to chronic Tacrolimus nephrotoxicity and the effect of ACE inhibitors and Ang II receptor blockers blockade on the expression of these cytokines and underlying renal damage.

In our study following the long term administration of Tac to rats, there were no significant difference in the functional parameters between healthy controls and the study group. However pathological findings revealed structural changes in Tac treated rats and TGF- β , PDGF, IL-6, VEGF expression was significantly increased in the study group and BMP-7 expression was reduced compared to healthy controls. Following RAS blockade by Quinapril and Valsartan TGF- β , PDGF, IL-6 and VEGF expression was significantly reduced in both of the above groups compared to Tac study group.

In conclusion, our data suggest that fibrogenic cytokines expression is significantly increased in Tac toxicity and RAS blockade seems downregulate fibrogenic cytokine expression.

İÇİNDEKİLER:

1-GİRİŞ VE AMAÇ	1
2-GENEL BİLGİLER	3
2.1.Tacrolimus	3-7
2.2.Tacrolimus nefrotoksisitesi	7
2.2.1.Akut nefrotoksisite	8-9
2.2.2.Subakut nefrotoksisite	9
2.2.3.Kronik nefrotoksisite	9-10
2.3.Nefrotoksisite Patofizyolojisi	10-12
2.4.Transforming Growth Factor-β (TGF-β)	13-16
2.5.Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	16-17
2.6.Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7)	17-21
2.7.Interleukin-6	21-23
2.8.Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	23-24
2.9.Renin angiotensin sistemi (RAS)	25-29
2.10.Angiotensin Konverting Enzim İnhibitörleri (ACEİ)	30-31
2.11.Angiotensin II reseptör antagonistleri (Sartanlar)	31
3.MATERYAL-METOD	32
4.SONUÇLAR	40
5.RESİMLER	57
6.TARTIŞMA	68
7.KAYNAKLAR	78
8.EK TEŞEKKÜR	94

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tacrolimus organ transplantasyonları sonrasında akut rejeksiyonu önlemek amacıyla kullanılan kalsinörin inhibitörleri grubundan immunosupresif bir ilaçtır (1). Tacrolimus'un, kısa ve uzun süreli kullanımında diğer konvansiyonel ilaçlara göre akut rejeksiyonu önlenmede daha etkin olduğu bildirilmektedir (2); ancak özellikle nefrotoksisite açısından diğer kalsinörin inhibitörü olan siklosporinden farklı olmadığı görüşü hakimdir (3, 4, 5).

Tacrolimus nefrotoksisitesi, böbrekte yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmaktadır (6). Tacrolimus toksisitesinde, renal kan akımı (RBF) ve glomerüler filtrasyon hızında (GFR) doza bağlı azalmayla birlikte olan *akut fonksiyonel toksisite* ve kronik, dozdan bağımsız, GFR'de progresif ve persistan bir azalmaya yol açan arterioloskleroz, glomeruloskleroz, tubuler atrofi ve intersitisyel fibröz ile karakterize *yapısal toksisite* görülebilir (7). Son yıllarda Tacrolimus tedavisine bağlı olarak gelişen nefrotoksisitenin patogenezinine yönelik çalışmalar yapılmakta ve bu etkiyi önleyecek ajanlar araştırılmaktadır. İlacın kendisinin mi yoksa metabolitlerinin mi patogeneizde rol oynadığı tam olarak bilinmemektedir (8).

Böbrek ve diğer organların kronik hastalıklarında gelişen fibrozisten sorumlu anahtar sitokin olan TGF- β (9,10) ve ilerleyici renal hasardan sorumlu sitokinlerden biri olarak kabul edilen PDGF B (10,13,14) ekspresyonunun Tacrolimus tedavisi ile arttığı yapılan insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (4,9,11,12,13,14). Literatürde Tac nefrotoksisitesinde diğer profibrojenik sitokinlerden olan IL-6 ve VEGF ekspresyonunu araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Son dönemde TGF- β ailesinden, Bone Morphogenetic Protein-7(BMP-7) adında potansiyel renotrofik bir faktör tanımlanmıştır (15). Embriyonik gelişim süresince yaygın olarak eksprese edilen BMP-7'nin organogenezdeki önemli rolünün yanında (16) antifibrotik özelliklerinin olduğu bildirilmektedir (17,18).

Renin-angiotensin sistemi (RAS)'nin temel peptidi olan angiotensin II (Ang II), çeşitli hücre tiplerinde hiperplazi ya da hipertrofiyi indükleyen bir renal büyüme faktörüdür (19,20,21). Bu vasoaktif peptid, mesengial ve tubuler hücreleri ve interstisyel fibroblastları aktive ederek ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentezini ve ekspresyonunu artırır. Ang II bu etkilerini TGF- β 1 gibi sitokinlerin salınımını arttırarak gerçekleştirmekte; ve böylece hücre

hipertrofisine ve fibrozise neden olmaktadır (22,23). Kronik Tacrolimus nefrotoksitesisi de dahil olmak üzere bir çok farklı nefropatilerde meydana gelen renal hasarda, Ang II'nin önemli bir mediatör olduğu düşünülmektedir. ACE inhibitörleri ya da angiotensin tip1 reseptör antagonistleri gibi angiotensin II etkilerini bloke eden tedavilerin insanlarda nefropati progresyonunu geciktirdiği ve böbrek hasarının birçok modelinde proteinüriyi, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve fibrozisi azalttığı bilinmektedir (24,25,26). Literatürde Ang II etkilerini bloke eden tedavilerin Tacrolimus nefrotoksitesisindeki etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

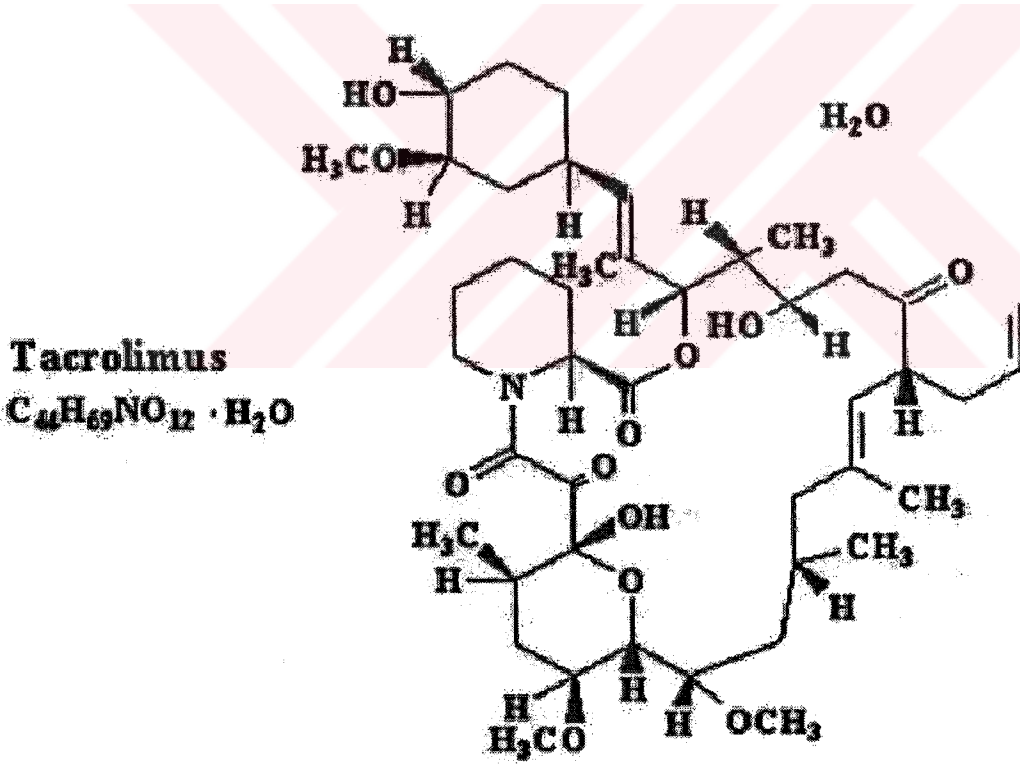
Çalışmamızın amacı, kronik Tacrolimus nefrotoksitesisinde böbrekte gelişen işlevsel ve yapısal hasarın patogenezinde TGF- β , PDGF, VEGF, IL-6 ekspresyonu ve antifibrotik özellikli bir sitokin olan BMP-7 ekspresyonu ile ACE inhibitörü ve Ang II reseptör blokleri tedavisinin bu sitokinler ve renal hasar üzerine etkisi araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tacrolimus

Stereptomyces tsukubaensis adlı immunosupresif özelliği olan bir toprak fungusu 1984'de keşfedilmiş ve FK 506 olarak kodlandırılmıştır. Bu ajan daha sonra, *Tsukuba macrolide immunosuppressive* kelimelerinden esinlenilerek Tacrolimus olarak adlandırılmıştır. Tacrolimus kalsinörin inhibitörü immunosupresif ilaç grubunun bir üyesidir. Klinikte ilk kez 1994'de, karaciğer transplantasyonunda ve 1997'de renal transplantasyonda akut rejeksiyonu önlemek amacıyla kullanım onayını almıştır (27). İzleyen yıllarda, diğer organ transplantasyonlarında ve çeşitli otoimmün hastalıklarda giderek artan biçimde kullanılmaya başlanmıştır (27,28).



Şekil-1: Tacrolimus'un yapısı (27)

Tacrolimus (C₄₄H₆₉NO₁₂.H₂O, moleküler ağırlık: 804) makrolid lakton bir antibiyotiktir. Beyaz kristaller ya da kristalin tozu şeklinde görülür. Suda çözünmez; satüre hidrokarbonlarda az miktarda, lipid ve diğer organik çözücülerde yüksek oranda çözünür (27).

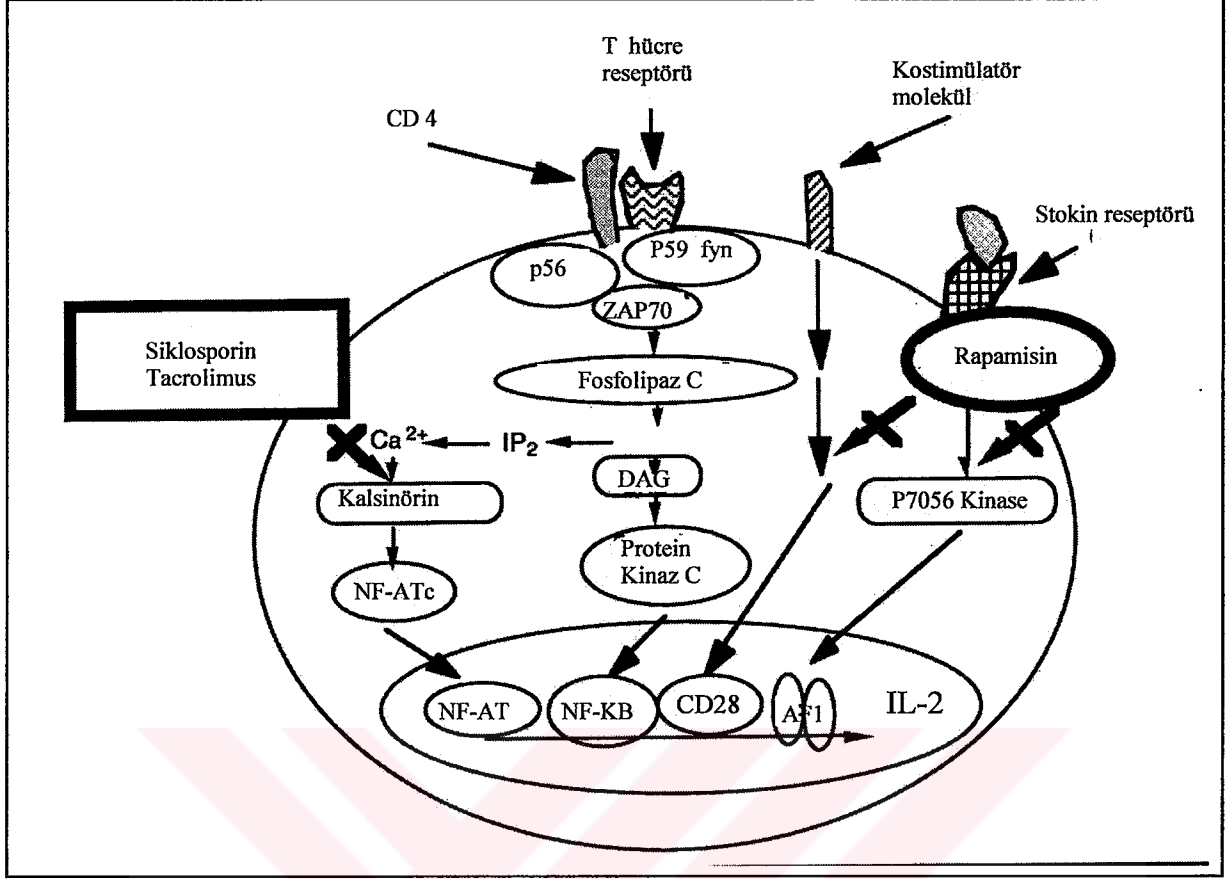
2.1.1. Tacrolimus'un Etki Mekanizması:

Tacrolimus, CD4 tipi T lenfositlerinde, T lenfosit reseptörünün antijenle uyarılması ile başlatılan sinyalleme kaskadında Ca²⁺ bağımlı bir enzim olan kalsinörünü, selektif bir şekilde inhibe eder (29). Kalsinörün inhibitörleri sellüler etkilerini immunofilin adındaki proteinlere bağlanarak gösterirler. Tacrolimus'u bağlayan immunofilin FK-binding protein (FKBP) adını almaktadır. Tacrolimus'un FKBP'ye bağlanması, bu proteinin kalsinörüne olan affinitesini artırır (27).

Olağan koşullarda kalsinörün bir defosfataz enzimi olup, NFAT(aktive T hücrelerinin nükleer faktörü) adlı, inaktif durumda stoplazmada bulunan faktörden fosfat gruplarını koparır ve onun etki yeri olan hücre çekirdeğine girmesini sağlar. NFAT, çekirdekte IL-2 geninin tetikleyici bölgesindeki bağlanma yerine bağlanarak IL-2 gen transkripsiyonunu ve böylece IL-2 üretimini artırır. IL-2 ise T lenfositlerinin klonal proliferasyonunu ve aktivasyonunu uyarır. Bu olay zincirinin Tacrolimus ile kalsinörün düzeyinde kesilmesi, IL-2 üretimini engelleyerek, antijenik uyarının IL-2 aracılığı ile (29) yaptığı sitotoksik, yardımcı T lenfositler ve doğal öldürücü (natural killer) hücrelerin proliferasyonunu (klonal ekspansiyonunu) inhibe eder (30,31). Bu şekilde, T hücresine bağlı antijenlerin yaptığı mitojenik etkinliği, IL-2, IL-2 reseptörü, IL-3, IL-4, TNF alfa, interferon gamma gibi immün sistemin önemli birçok düzenleyici proteininin yapımını da dolaylı olarak azaltır (29).

Tacrolimus ayrıca daha az oranda olmakla birlikte, humoral immün cevabı (B hücre proliferasyonu) da inhibe etmektedir (32,33). Tacrolimus'un IL-2'yi inhibe etme gücü CsA'dan 10-100 kat daha fazladır (34).

Tacrolimus'un bir başka etkisi de TGF-β ekspresyonunda artışa yol açmaktır. Kalsinörün inhibitörlerinin, graft içinde TGF-β düzeylerini arttırdığı ve bu yolla allograftta fibrozis geliştirdiği gösterilmiştir (27). Bu etkilerin her iki kalsinörün inhibitöründe de bulunmakla birlikte, hangisinin TGF-β ekspresyonunu daha fazla arttırdığı konusu ile ilgili çelişkili yayınlar bulunmaktadır (1,11,35).



Şekil-2: Tacrolimusun yaptığı immünsupresyonun mekanizması (36)

2.1.3 Tacrolimus'un Farmakokinetiki

2.1.3.1. Emilimi: Oral biyoyararlanımı %5 ile 67 arasında değişmekte, ortalama %29 olduğu bildirilmektedir. Emilimdeki değişkenliğin transplante edilen organ ya da yaşla korelasyonu yoktur. Pediyatrik hasta popülasyonunda karaciğerde daha hızlı metabolize edilir. İlacın metabolizmasında etnik farklılıklar da bildirilmiştir. Orta düzeyde yağ içeren besinlerin, absorpsiyon hızını ve biyoyararlanımı azalttığı gösterilmiştir (27).

2.1.3.2. Dağılımı: Barsaktan emildikten sonra kanda primer olarak eritrositlere geçer. Kan konsantrasyonu, plazmadan 10-30 kat yüksektir. Siklosporin A (CsA)'dan farklı olarak plazma lipoproteinlerine bağlanmaz, buna karşılık akut faz proteinlerinden α_1 -asit glikoproteine bağlanır. Fetal dolaşıma ve anne sütüne geçer (27).

2.1.3.3. Metabolizasyonu: Tamamına yakını karaciğerde CYP3A4 sistemi ile metabolize edilir. Metabolitlerinin gerçek sayısı bilinmemektedir; fakat 15'den fazla sayıda metaboliti bildirilmiştir (27).

2.1.3.4. Atılımı: Esas olarak safra ile atılır. Renal eksresyonu %2'den azdır (27).

2.1.3.5. Dozu: Oral başlangıç dozu günlük 0.2-0.3 mg/kg/gün iki bölünmüş dozda olmakla birlikte hedef kan düzeyine göre günlük dozu ayarlanır. Toksik yan etkilerden sakınmak ve immunsupresyon için yeterli Tacrolimus konsantrasyonunu sağlayabilmek için terapötik ilaç monitörizasyonuna ihtiyaç vardır (27,37). Hedef kan düzeyi ilk 3 ay için 10-20 ng/ ml, sonrasında ise 5-12 ng/ ml olarak önerilir (38).

2.1.4. İlaç etkileşimleri:

Tacrolimus düzeyi sitokrom p450-3A4 enzim induksiyonu yapan tüm ilaçlardan etkilenir (27). Bu yolla etkileştiği ilaçlar ve etkileşim şekli Tablo-1'de verilmiştir.

Tablo-1: Tacrolimus ile etkileşim gösteren ilaçlar (38)

Tacrolimus düzeyini arttıranlar	Tacrolimus düzeyini azaltanlar	Tacrolimus nefrotoksisiteyi arttıranlar
Kalsiyum kanal blokerleri Diltizem, Nikardipin, Verapamil Makrolid antibiyotikler Klaritromisin, Eritromisin) Antifungal ajanlar Klotrimazol, Flukanazol, İtrakanazol, Ketakanazol, Diğer ilaçlar CsA, Bromokriptin, Simetidin, Danasol, Metilprednizolon, Metoklopramid	Antikonvulzanlar Karbamazepin, Fenobarbital, Fenitoin Antibiyotikler Rifabutın, Rifampin	Aminoglikozidler Amfoterisin Sisplatin CsA Non-streoidal antiinflamatuvar ajanlar İbuprofen

2.1.5. Yan etkileri:

Başlıca yan etkileri nefrotoksisite, nörotoksisite (%8.4) ve enfeksiyondur (39,40). Ayrıca gastrointestinal rahatsızlıklar, hipomagnezemi (40), hipertansiyon, hiperkalemi (%50) ve kardiyomiyopati (29) de yapabildiği bildirilmiştir (40). Hiperkolestolemi (31), hirsutizm ve gingival hiperplazi yapmaması bu kalsinörin inhibitörünü siklosporine göre kozmetik ve metabolik yan etkiler açısından üstün kılmaktadır (39).

2.1.7. Kullanım alanı

Tacrolimus (Tac) organ transplantasyonunda ve bazı otoimmün hastalıklarda kullanılmaktadır (41,42,43,44). Diğer immunosupresif rejimlerle rejeksiyon ya da ilaç ilişkili toksisite gelişen hastalarda önemli bir terapotik alternatiftir. En sık kullanıldığı iki alan karaciğer ve böbrek transplantasyonu olmakla birlikte, diğer organ transplantasyonlarında (27) ve çeşitli otoimmün hastalıklarda giderek artan biçimde kullanılmaya başlanmıştır (27,28). Akut rejeksiyon gelişmesinin önlenmesinde daha üstün olmasına ek olarak böbrek transplantasyonunda bir başka kullanımı da siklosporin kullanırken gelişen akut rejeksiyon tedavisinde 'kurtarma' amacıyla kullanılmasıdır (29).

2.2. Tacrolimus nefrotoksisitesi:

Kalsinörin inhibitörleri grubuna ait nefrotoksisite yan etkisi, bu grup ilaçların kullanımını sınırlayan en önemli sorundur (45,46). Eldeki veriler, bu sebeple geliştirilen Tacrolimus'un da nefrotoksik olduğunu göstermiştir (47). Tacrolimus nefrotoksisitesi sıklığı CsA'a benzerlik göstermektedir (3). Nefrotoksisite açısından CsA ve Tacrolimusun birbirlerine üstünlüğü konusundaki yayınlar çelişkilidir (3,4,5,40,48); sıklığı %17 (49) ile % 46.2 (50) arasında değişmektedir.

Tacrolimusun neden olduğu renal disfonksiyon üç değişik klinik formda karşımıza çıkar:

- 1) Akut nefrotoksisite
- 2) Subakut nefrotoksisite
- 3) Kronik nefrotoksisite

Tablo-2: Tacrolimusun sebep olduğu nefrotoksisitenin çeşitleri (51)

Tip	Zamanı	Yatkınlık oluşturan faktörler	Tedavi
Akut	Günler	Donor hipotansiyonu Çocuk donör	Tacrolimustan sakınılması
Subakut	Günler-aylar	Yüksek ilaç düzeyi	Tacrolimus dozunun azaltılması
Kronik	Aylar	Kronik rejeksiyon	Siralimusa geçilmesi

2.2.1. Akut nefrotoksisite

Erken post-op dönemde görülür (51) ve daha çok doza bağımlıdır (52,53). Erken dönemde görülen Tacrolimus toksisitesi işlevsel ve yapısal toksisite olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. İşlevsel değişiklikler yapısal değişiklikler olmaksızın olabilir, oysa ki yapısal lezyonlar daima işlevsel değişikliklere eşlik eder (6).

2.2.1.1. Akut işlevsel toksisite:

Tacrolimus kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan akut nefrotoksisite ilacın hemodinamik etkilerine bağlıdır. Tacrolimus afferent arteriolar vasokonstruksiyona neden olur ve bunun sonucunda glomerüler filtrasyon hızında azalma meydana gelir. Tacrolimusa bağlı olarak meydana gelen vasokonstruksiyonda renin-angiotensin sistem aktivasyonu, artmış sempatik aktivite, prostaglandin metabolizmasında değişiklikler, endotelin sekresyonunda artış (52,53), ve nitrik oksit sentez inhibisyonu (55) gibi mekanizmalar sorumlu tutulmuştur (51).

GFR'deki azalmanın derecesi değişkendir. Toksisitenin hafif formlarında glomerüler filtrasyon hızı ve renal kan akımında hafif azalmayla birlikte sodyum retansiyonu, hipomagnezemi, hiperürisemi, hiperkalemi ve hiperkloremik asidoz görülür. Tac tedavisine bağlı olarak gelişen fonksiyonel toksisitenin en ciddi formunda, poliüri ya da oligo-anüriyle birlikte akut renal yetmezlik görülebilir (48,52,56).

Tacrolimus ile oluşan akut nefrotoksisite işlevsel, genellikle doza bağımlı ve geri dönüşümlüdür. Saf fonksiyonel nefrotoksisitede belirgin yapısal anormallikler bulunmaz (53,56).

2.2.1.2. Akut yapısal toksisite

İki çeşit morfolojik değişiklik ayırt edilebilir.

2.2.1.2.1. Tubulopati

Tac ile tedavi edilen hastalarda tubuler epitelyal hücrelerdeki histolojik değişiklikler, başlıca, stoplazmanın isometrik vakuolizasyonu, dev mitokondri oluşumu ve mikrokalsifikasyonlardan oluşur (6). Bu değişiklikler proksimal tubullerde en belirgindir (53,56,57,58,59,60). Doz azaltıldıktan sonra tubuler lezyonlar hızla geri döner (53).

2.2.1.1.2. Mikroanjiyopati (tubulointersitisyel lezyonlarla birlikte)

Daha ciddi bir nefrotoksisitedir ve plasma kreatininde önemli artışa neden olur. Bu durum sıklıkla küçük arterlerin mediasındaki fokal miyozit nekrozuyla karakterize arteriolopatiyle ilişkilidir, ancak intimal değişiklikler yoktur (61,62). İlaç nefrotoksitesinde doz azaltıldığında renal disfonksiyon ve morfolojik değişiklikler geri dönebilir (51).

Mikroanjiopatide afferent arterioldeki yapısal değişiklikler, histolojik değişikliklerin en önemlisidir. Bu değişiklikler glomerülleri ve tubulointersitisyel alanı etkileyen geri dönüşümsüz renal hasara sebep olabilir (53).

2.2.2. Subakut nefrotoksisite:

Transplantasyondan sonra günler-aylar içinde ortaya çıkar. Genellikle Tacrolimus düzeylerindeki yükselmeye eşlik eder. Tacrolimus dozunun azaltılmasıyla olay 3- 14 gün içinde geriye döner (51). Graft rejeksiyonuyla ayrımının yapılması önemlidir (63). Bu açıdan kan düzeyi ve biyopsi yol gösterici olur.

2.2.3. Kronik renal toksisite

En erken tedavinin başlangıcından 30 gün sonra görülür. Direkt tubuler ya da glomeruler hasardan kaynaklanır. Değişmez şekilde kalıcıdır ve dozla ya da ilaç düzeyiyle ilişkisizdir (40).

Kronik nefrotoksisite renal disfonksiyonun ilerleyici bir formudur. Kronik nefrotoksisiteye sebep olan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Morfolojik bulgular kronik tubulointersitisyel hasar, glomerulosklerozis ve arteriol duvarında fibromukoid birikimini içerir (51).

Toksik nefropatide, renal biyopside, musinoid intimal kalınlaşma ve nodüler hyalin birikimi olan arteriolar lezyonlar görülür (62). Arteriollerde skar, glomerüler kapillerde tıkanma, çizgili intersitisyel fibrozis, geç aşamada diffüz intersitisyel fibrozis ve glomerüler skleroza yol açar. Mihatsch ve arkadaşları çizgili intersitisyel fibrozis ve tubuler atrofi sonucu oluşan vasküler tıkanmanın sebebinin arteriolopati olduğunu göstermişlerdir (51,62). Tutulan damarların boyutu toksik nefropatiyi kronik rejeksiyondan ayırt etmeye olanak sağlar. Renal toksisite vakalarında sadece küçük damarlar etkilenirken; kronik allograft nefropatisinde vasküler lezyonlar sadece arteriollerini değil; ayrıca arkuat ve interlobüler arterleri de etkiler (62).

Tablo-3: Kronik yapısal Tacrolimus nefrotoksisitesinde morfolojik bulgular (64)

	Kronik yapısal Tacrolimus nefrotoksisitesi
Tubuller	Atrofi
İntersitisyum	Çizgili intersitisyel fibröz
Arterioller	Hyalin veya fibromukoid birikimi
Glomerül	Sklerozis

2.3. Nefrotoksisite Patofizyolojisi

Tacrolimus ile ilgili renal disfonksiyonun kalsinörin inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (65). Sağlıklı dokudaki hücrelere kalsiyum girişi dihidropiridine duyarlı kalsiyum kanalları aracılığıyla denetlenir (66). Kalsinörin inhibisyonu, Ca kanallarını açarak kalsiyum akışını artırır; vasküler düz kas hücresine kalsiyum girişi ise vazokonstrüksiyona neden olur. Bu nedenle kalsinörin inhibitörleri, afferent arteriolde vasokonstrüksiyon yaparak renal kan akımında azalmaya yol açarlar (67,68,69,70).

Tacrolimus tedavisi ile oluşan vasokonstrüksiyona ayrıca endotelyuma doğrudan toksik etki ve bazı medyatörlerin sekresyonu da katkıda bulunur. Bu medyatörler, endotelin, renin, prostanoidler ve nitrik oksittir (4). Endotelin bilinen en güçlü vazokonstrüktördür. Tacrolimus tedavisi, endotelin sekresyonunu sadece kültür endotel hücrelerinde değil aynı zamanda mesengial hücreler ve tubuler hücrelerde de artırır (71,72,73). Ayrıca vazokonstrüksiyonda sempatik sinir sistemi aktivasyonu, prostaglandin metabolizmasında değişiklikler, nitrik oksit üretiminde azalma (74,75) gibi mekanizmaların da etkili olduğu bildirilmiştir (51).

Artmış renin immunreaktivitesiyle birlikte jukstaglomerüler aparat hiperplazisi (76), ve Tacrolimus ile oluşan fonksiyonel ve morfolojik anormalliklerin gelişiminde Na depleksiyonunun kritik bir rol oynaması (77,78) kronik Tacrolimus nefropatisinde renin-angiotensin sisteminin de rolü olduğunu düşündürmüştür (28). RAS aktivasyonu, angiotensinin sebep olduğu vasokonstrüksiyon aracılığıyla medüller iskemiye katkıda bulunmakta, ayrıca Ang II, vasokonstriktif etkisinden bağımsız mekanizmalarla, renal büyüme faktörü etkisiyle, mesengial ve proksimal tubuler hücreler üzerinde hipertrofik ve proliferatif etkiler göstermektedir (28).

Başlangıçta GFR'de azalmaya vasokonstrüksiyon sebep olur; bunu daha geç dönemde kısmen büyüme faktörlerinin de sorumlu olduğu, mikrovasküler yapıda kalınlaşma ve daralma izler (4). Tacrolimus nefrotoksitesinde vazokonstrüksiyonun sebep olduğu kronik iskemi, endotelin, TGF- β ve PDGF'in vasküler ekspresyonunu artırır (4). Jukstaglomerüler apparatus ve afferent arteriolde de, TGF- β ekspresyonu, Tacrolimus tedavisi ve iskemi süresiyle orantılı olarak artar (4). Güçlü bir immunosupresif de olan TGF- β 'nın, kollajen, fibronektin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretimini tetikleyerek fibrojenik özelliğinin olduğu gösterilmiştir (79). PDGF iskemi olmaksızın da eksprese olabilir. Her iki büyüme faktörü de özellikle iskemide, bağımsız ya da sinerjik olarak, ya renin sekresyonunu ya da düz kas hücre proliferasyonunu stimüle ederek, vasküler duvar daralması ve kalınlaşmasında rol oynayabilir. Renin, TGF- β ve PDGF arasındaki etkileşim çok yönlüdür; tümü jukstaglomerüler hücrelerde bulunur (80,81) ve vasküler patolojiye katkıda bulunurlar.

Tacrolimus ayrıca özellikle hasarlanmış intima trombosit yapışmasını artırır; endotelin ve tromboksan A2 salınımını ve/veya sentezini, düz kas hücre proliferasyonunu artırır. Bu etkiler kan akımını ve mesengial hücre fizyolojisini değiştirir, böylece hipertansiyona eğilimi artırır ve GFR'yi azaltır. Azalmış kan akımı en azından başlangıçta fokal, sonra çizgili

nihayetinde oldukça yaygın intersitisyal fibrozisle sonlanır, bu sürece TGF- β sentezindeki artış da katkıda bulunur (82,83).

Renal disfonksiyona lokal humoral medyatör profilindeki değişim de eşlik eder (Tablo-4) ADP ile uyarılmış trombosit agregasyonunun artması, tromboplastin üretimi, faktör VII sentezi, trombin salınımı PDGF üretiminde artış gibi mekanizmalarla trombojenisitenin artması humoral faktörlere ek olarak vaskülopatik hasarı artırır.

Tablo-4: Kalsinörin inhibitörlerinin sebep olduğu renal hasarın vaskülopatik komponentleri (51)

Vasokonstrüktörlere karşı lokal vasodilatatör üretiminin azalması
↑ Endotelin
↑TGF- β
↓Endotelyal-kaynaklı relaksasyon faktörü
↑Lokal renin salınımı
↓Prostasiklin
↑Tromboksan A2
Serbest oksijen radikalleri üretiminde artış
Sempatik tonusta artış
Kalsiyum bağımlı vasokonstrüktör mekanizmalarda artış
Kanın trombojenisitesinde artış
↑ADP → trombosit agregasyonu
↑ Tromboplastin
↑ Faktör VII
↑ Trombin → ↑PDGF
Atherojenisitede artış
↑ Kolesterol

2.4. Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

TGF- β çok yönlü fonksiyonları olan bir sitokindir. Epitelyal, endotelyal, hemotopoetik, nöronal, ve konnektif doku hücreleri dahil olmak üzere, hemen hemen vücuttaki her hücre TGF- β ve reseptörünü üretir. TGF- β hücrelerin proliferasyon ve differansiyasyonu, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi ve angiogenezi denetler. TGF- β üretiminde artma ya da azalma, ateroskleroz, böbrek, karaciğer ve akciğerin fibrotik hastalığı gibi çok sayıda hastalıkla ilişkilidir (84).

2.4.1. Yapısı:

Yumuşak agarda normal hücreleri sanki virüslerle transforme edilmiş gibi uyardığının gözlemlenmesi nedeniyle Transforming Growth Factor- β (TGF- β) verilmiştir. TGF- β , bone morfogenetik protein ve aktivinlerin de yer aldığı dimerik polipeptid büyüme faktör ailesindedir (84).

TGF- β 'nın 3 isoformu vardır. TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. Her bir isoform farklı bir gen tarafından kodlanır ve dokuya özgü olarak eksprese edilir. TGF- β 1 mRNA'sı endotelyal, hemotopoetik, ve konnektif doku hücrelerince; TGF- β 2 mRNA'sı epitelyal, ve nöronal hücrelerince; TGF- β 3 mRNA'sı primer olaral mezenkimal hücrelerince eksprese edilir. Gelişim süresince TGF- β 1 ve TGF- β 3 morfogenez sırasında erken dönemde, ve TGF- β 2 ise olgun ve differansiye epitelyumdan geç dönemde eksprese edilir. Üç isoformun da memelilerde yüksek oranda korunması her bir isoformun kritik biyolojik fonksiyonu olduğunu gösterir. Bu üç isoformun TGF- β reseptörlerine bağlanma affiniteleri farklıdır ve farelerde her bir isoformun delesyonu, farklı fenotiplere sebep olur (85).

Her bir TGF- β isoformu, TGF- β 'ya ilaveten propeptid alan içeren büyük bir öncü molekül olarak sentez edilir. TGF- β , hücre tarafından sekrete edilmeden önce bu propeptidden ayrılır, sekrete edildikten sonra TGF- β 'nın çoğu, TGF- β kompleksi olarak ekstrasellüler matrikste depolanır. TGF- β 'nın proteine bağlı bulunması, reseptörüne bağlanmasını önler. In vivo olarak, TGF- β , çok işlevli matriks glikoproteini trombospondin-1 ile kompleks yapmış halde salınır. TGF- β , kompleksin plasmin aracılığıyla parçalanması ile aktive olur. TGF- β ve reseptörlerinin çoğunun hücrede olmasından dolayı, bu aktivasyon TGF- β etkisindeki kritik

düzenleyici adımdır. Bu sürecin istisnası trombositlerdir; TGF- β trombositlerde intrasellüler granüller halinde depolanır ve trombosit aktivasyonu ile salınır (84).

TGF- β hücre yüzeyinde yer alan tip I, tip II, tip III olarak bilinen reseptörlere yüksek affinite ile bağlanarak sellüler olayları düzenler. Tip I ve Tip II reseptörler Smad olarak bilinen birkaç transkripsiyon faktörünü fosforilleyerek intrasellüler sinyali başlatan serin-treonin kinaz aktivitesi gösteren intrasellüler kısım içerirler. Bugün 10 Smad proteini tanımlanmıştır; TGF- β 'nın reseptörlere bağlanması ile aktif hale gelen bu proteinlerin bir kısmı TGF- β sinyalinin iletiminden (Smad2 ve Smad3), bir kısmı ise kaskadın kendi içindeki inhibisyonundan (Smad 6 ve Smad 7) sorumludur. TGF- β ayrıca mitojenle aktive edilmiş ve stres ile aktive edilmiş protein kinaz yolları aracılığıyla da etki yapar (84).

2.4.2. Biyolojik etkileri

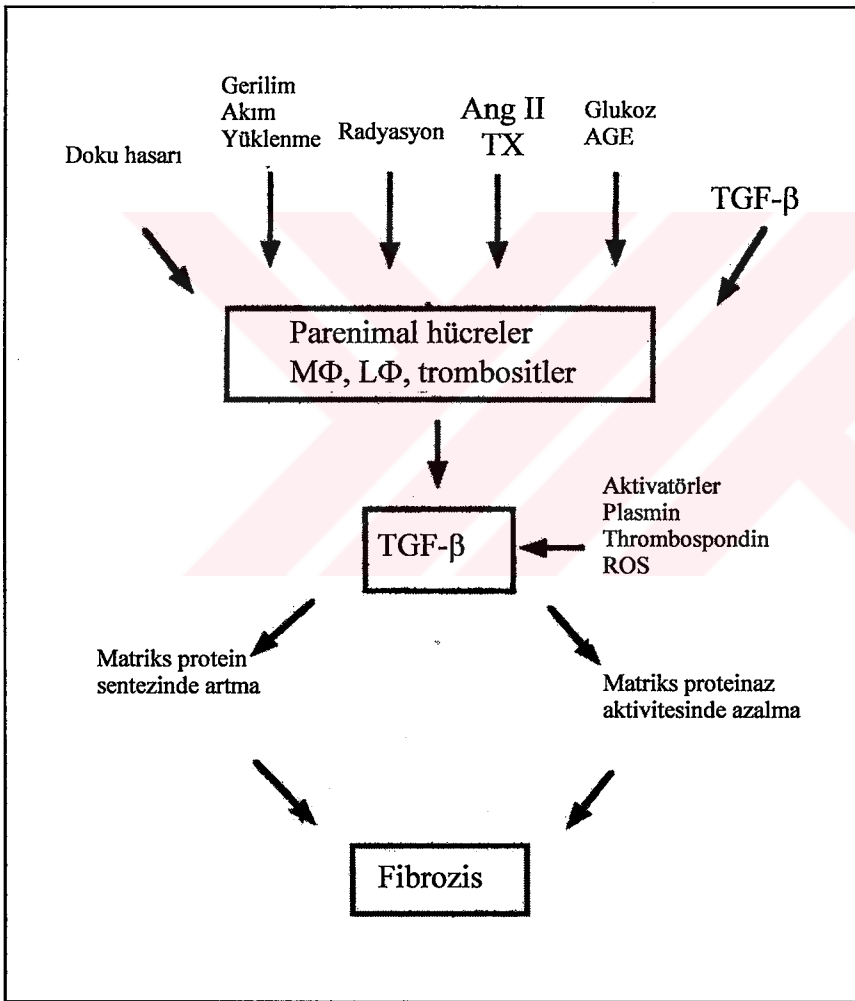
2.4.2.1. Ekstrasellüler matriks proteinleri üzerinde TGF- β 'nın etkileri

Ekstrasellüler matriksin yapısal destek, sellüler adezyon, sıvı ve makromoleküllerin hareketine karşı bariyer sağlamak gibi önemli fonksiyonları vardır. Her bir doku tipinde özel matriks toplanması doku fonksiyonlarının özelleşmesine katkıda bulunur. Bu özgün doku fonksiyonları özel ekstrasellüler matriks proteinleri ile başarılır. TGF- β ekstrasellüler matriks üretimi ve depozisyonunun en güçlü düzenleyicilerinden biridir. İki major mekanizma ile ekstrasellüler matriksin adhesif özelliklerini etkiler ve üretimini uyarır (86). Birincisi, TGF- β , fibroblastları ve ekstrasellüler matriks proteinlerini, kollajen, fibronektin, ve integrin gibi hücre adezyon proteinlerini üreten diğer hücreleri uyarır. İkincisi TGF- β ; kollajenaz, heparinaz ve stromelysin gibi, ekstrasellüler matriks degradasyonu yapan enzimlerin üretimini azaltır; plasminogen-activator inhibitor type I ve metalloproteazların doku inhibitörleri gibi ekstrasellüler matriks degradasyonu yapan inhibitör enzimlerin proteinlerinin sentezini artırır. Bu değişikliklerin net etkisi ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentezini arttırmak ve hücreye özgü olarak da, hücrelerin adhesif özelliklerini arttırmak ya da azaltmaktır. Normal erişkin hayvanlarda matriks proteinlerinin yıkımı ve yapımı dengededir; bu denge TGF- β 'nın ve diğer sitokinlerin sellüler etkileri ile kontrol edilir (84).

TGF- β immun sistemi baskılayıp ekstrasellüler matriks komponentlerini uyardığından yara iyileşmesi ve doku onarımında esansiyel bir role sahiptir; bununla birlikte TGF- β 'nın aşırı üretilmesi ve skar dokusunun aşırı birikimi fibrozise sebep olabilir (87). Hayvanlarda TGF-

β 'nın fazla üretimi böbrek, karaciğer ve akciğerde fibrozise sebep olur (84). İnsanlarda da TGF- β birçok organın fibrozisine katkıda bulunur (88).

TGF- β mRNA ekspresyonu ve TGF- β üretimi IgA nefropatisi, fokal ve segmental glomerülonefrit, lupus nefriti ve diyabetik ve insan immün yetersizlik virüsüne (HIV) bağlı nefropatide artmıştır. TGF- β 1 gen polimorfizmi insanlarda ekspresyon düzeyini düzenler (89,90,91). Bu polimorfizmler kişinin fibrotik hastalığa eğiliminde rol oynayabilir (84).



Şekil-3: Doku fibrozisinde TGF- β 'nın rolü.

TGF- β gen ekspresyonunu, protein ekspresyonunu, ya da parenkimal hücreler, doku makrofajları(M ϕ) ve lenfositlerin(L ϕ) aktivitesini artırarak fibrozise yol açan çeşitli faktörler. AII: Angiotensin II; TX: Tromboksan; AGE: İleri glikozillenmiş son ürünler; ROS: Reaktif oksijen türleri (88)

Akciğer ve böbrek transplantasyonu yapılmış kronik rejeksiyonlu hastalarda dokuda TGF- β ekspresyonu artmıştır (88). CsA ve Tac gibi kalsinörin inhibitörü ilaçların kullanılmasının TGF- β 'yi arttırdığı hayvan modellerinde gösterilmiştir. CsA, kültür tubuler epitelyum hücrelerinde TGF- β üretimini stimüle eder (88). Tacrolimus nefrotoksitesinde de vasküler TGF- β ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (4).

2.4.2.2. TGF- β ve angiotensin arasındaki etkileşim

Ang II hem renal hem de kardiyovasküler hastalıklarda patogenetik faktör olarak suçlanmaktadır. Son zamanlarda Ang II'nin, proksimal tubuler hücrelerde sellüler hipertrofiyi, kollajen IV mRNA ekspresyonu ve protein sentezini stimüle eden lokal büyüme faktör fonksiyonu ve sıçan mesengial hücrelerinde biglikan, fibronektin, kollajen I mRNA ve proteinini uyardığı gösterilmiştir. Ang II'nin büyüme faktör fonksiyonlarının çoğu TGF- β aracılığı ilelerdir. Kültür mesengial hücrelerine Ang II eklenmesi, TGF- β mRNA ve aktif TGF- β proteinini artırır. Ayrıca Ang II'nin matriks protein sentezi üzerindeki stimulator etkileri TGF- β nötralize eden antikorların eklenmesi ile bloke edilebilir. Ang II'nin kardiyak endotel hücreleri ve fibroblastlardan TGF- β üretimini stimüle etmesi, sistemik hipertansiyonun eşlik ettiği kardiyak hipertrofi ve vasküler yeniden yapılanmada (remodeling), AII- TGF- β aksının önemli bir rol oynadığını gösterir. Angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri kalp ve böbrekte hem hemodinamik mekanizmalarla basınç ve akımı azaltarak, hem de antifibrotik mekanizmalarla fibrozisi azaltır (88).

2.5. Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Platelet-derived growth faktör (PDGF), 30 yıl kadar önce (92) trombositlerden izole edilmiştir (93). Çoğu konnektif hücre tipi üzerinde mitojenik ve kemotaktik aktivite gösteren ve yaygın olarak eksprese edilen bir büyüme faktörüdür (94).

Hücre proliferasyonunu, hücre migrasyonunu ve ekstrasellüler matriks sentezini uyarır. Deneysel glomerulonefritlerde mesengial hücre proliferasyonu için önemli bir büyüme faktörüdür. PDGF böbrekte mesengial hücreler, endotelial hücreler, kalıntı böbrek modelinde makrofajlar ve düz kas hücreleri tarafından sentez edilir. Floege ve arkadaşları glomerüler ekspresyonun glomerulosklerozdan önce olduğunu göstermiştir. İnsan böbreğinde PDGF ve PDGF reseptörü ekspresyonunun otokrin ya da parakrin bir medyatör olarak glomerulonefritteki glomerüler hasara katıldığı çok sayıda yayında bildirilmiştir (93).

2.5.1. Yapısı:

PDGF ailesi iki polipeptid zincirden oluşan 3 proteini içerir (94). A ve B polipeptid zincirleri disülfid bağlarıyla homo ve heterodimerler oluşturarak PDGF'nin üç izoformunu (PDGF-AA, -AB, -BB) oluşturur (94,95). İki çeşit PDGF reseptör proteini mevcuttur. PDGFR- α , PDGFR β . Her iki reseptör de, büyüme faktörü reseptörlerinin protein tirozin kinaz ailesinin üyesidirler (95).

PDGF farklı hücre tiplerinde migrasyon, proliferasyon ve differensiyasyonu indükler (92). Onkogenez (95), yara iyileşmesi (96), ve aterosklerozda rol oynadığı gibi (97), embriyonik renal gelişimde de rolü vardır (98,99).

2.5.3. PDGF ve böbrek

PDGF hem insan hastalıklarında hem de deneysel modellerde progresif renal hasar patogenezinde sıkça suçlanmaktadır. PDGF artmış ekspresyonunun glomerüller ve diğer renal hastalıklardaki patolojik önemi daha önce bildirilmiştir (100).

PDGF, hem renal hücreler ve hem de göç yoluyla gelen makrofajlar tarafından sentezlenir. PDGF etkileri mesengiyal hücre proliferasyonunu stimüle etmek, ekstrasellüler matris (ECM) sentezini arttırmak ve TGF- β 'nin ekspresyonunu arttırmaktır. Ayrıca, angiotensin II endotelin, inflamatuvar sitokinler, ileri glikozillenmiş son ürünleri içeren, renal hastalıkta suçlanan çeşitli faktörlere cevap olarak da, PDGF düzeyleri artar (100).

2.6. Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7)

Son 20 yıl içinde TGF- β ailesine mensup, bir çok organın oluşum sürecinde kritik rol oynayan "bone morphogenetic protein" (BMP) adında bir alt grup tanımlanmıştır. Otuzdan fazla üyesi bulunan TGF- β ailesinin 2/3'ünden fazlasını BMP'ler oluşturur. BMP'ler osteojenik proteinler (OP), kartilajdan türeyen morfogenetik proteinler (CDMP) ya da büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF) olarak da adlandırılırlar (101).

Hemotopoetik kemik elementlerinin bulunduğu ekstraaksiyal iskelet kemikleri gibi kemiklerde, endokondrial kemik dokusunun formasyonunda rol oynadıklarından kemik morfogenetik proteini (bone morfogenetik protein) olarak adlandırılırlar (16). Bu proteinlerin tanınması, ekspresyon biçimleri ve fizyolojik fonksiyonları, sadece iskelet gelişiminde rol oynamadıklarını göstermiştir (102,103). BMP-7'nin embriyonik gelişim süresince yaygın

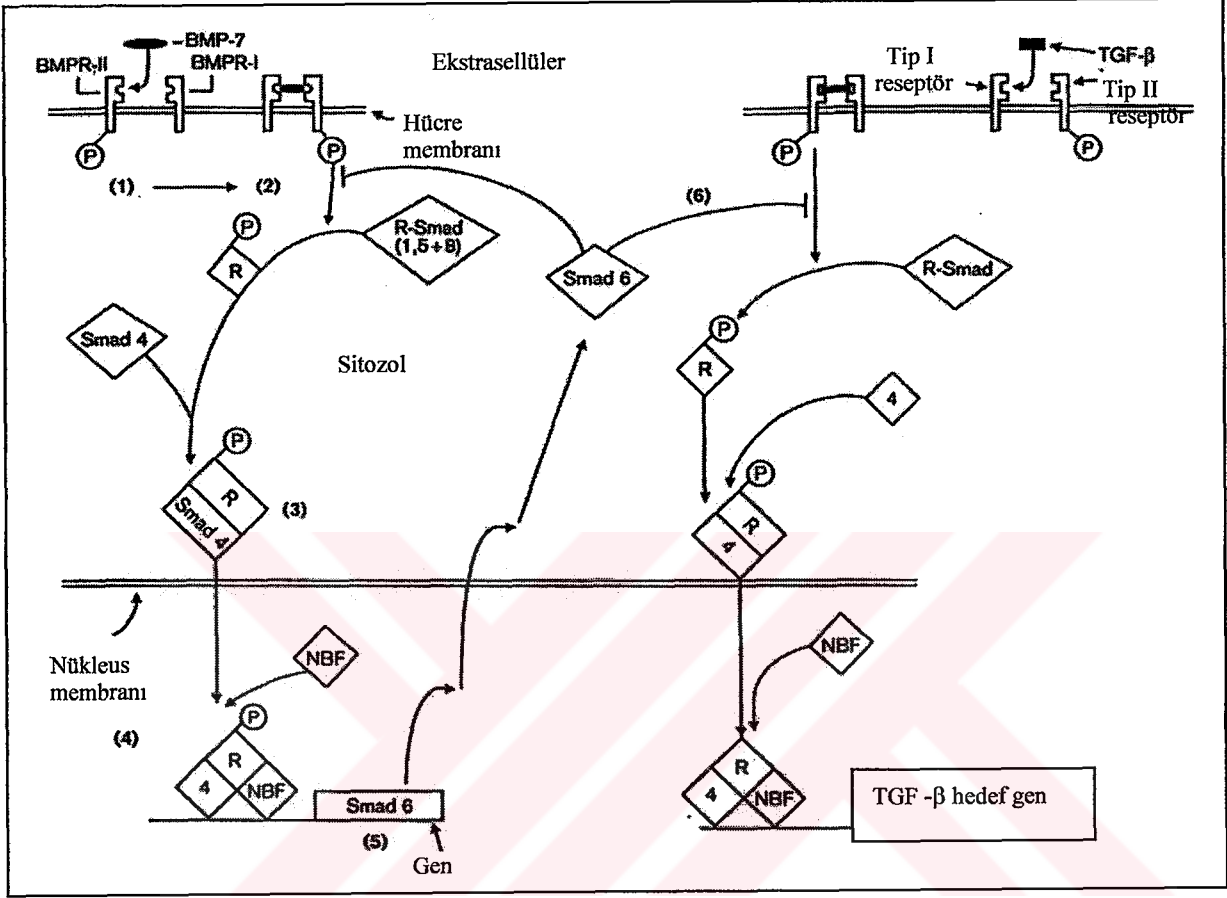
olarak eksprese edildiğini ve iskelet, göz, böbrek, kardiyovasküler gelişimde kritik rol oynadığını gösteren çok sayıda hayvan çalışması bulunmaktadır (104-109). İnsan BMP-7 geni 20. kromozomun 5' bölgesinde yerleşmiştir (110).

2.6.1. Yapısı: BMP-7 sistein aminoasitleri arasındaki disülfid bağlarıyla birbirine bağlanmış birbirinin aynı iki proteininin (monomer) birleşmesiyle oluşmuş bir dimerdir (111). Kemik morfogenetik proteinleri büyük öncü proteinler olarak sentez edilirler (15). Arg-X-X Arg bağlantısının karboksiterminallerinden proteolitik olarak ayrılarak oluşturulurlar. İki TGF- β ailesi üyesi olan TGF- β 2 and BMP-7'nin kristal yapısının analizinde, ailenin tüm üyelerinde değişmez şekilde, C-terminal bölgede yerleşen 6 sistein rezidüsü içeren sistein bağının monomerin merkezini oluşturduğu görülür (112,113).

BMP'lerin sinyal fonksiyonunu yerine getirmek için ilgili reseptöre bağlanmalarını takiben tetiklenen yolak Şekil-4'de gösterilmektedir.

2.6.3. BMP-7 ve böbrek:

BMP-7 böbrek gelişiminde anahtar bir morfojenik sinyaldir (107). Daha çok böbrekte olmak üzere (115,116), erişkin memelilerde de bir çok hücreden (107,108) üretilmeye devam eder (86,114,117,118) ayrıca dolaşımında da bulunur (116). Metanefronların oluşumu ve formasyonunda kritik rol oynar (16). BMP-7 ekspresyonunun, üreterik tomurcuğun dallanmasının koordinasyonunda, mezenkimin yoğunlaşması ve renal epitelyum formasyonunda gerekli olduğu görülmüştür (106,107). Farelerde BMP-7 delesyonu metanefrik mezenkimin differansiyasyonunda yetersizliğe ve üreterik tomurcuğun etrafında mezenkimal hücre kondansasyonunda kayıba yol açar; bunun sonucunda, glomerüller ve tubuler agenezi ve ciddi hipoplastik böbrekler ortaya çıkar (107,108,117). BMP-7 delesyonu olan farelerde doğumda nefron sayısı azalmıştır, bu hayvanlar letal polikistik hastalık geliştirerek doğumdan kısa süre sonra üremi sebebiyle ölürler (106,116). BMP-7 yokluğu böbrek morfogenezinde yetersizlikle karakterizedir; histolojik kesitlerde normal farelerde yaklaşık 100 glomerül bulunurken BMP-7 yokluğunda 3'den daha az glomerül içeren küçük disgenik böbrek oluşur (15). Moleküler analizler BMP-7'nin en erken glomerül indükleyicilerden biri olduğunu göstermiştir.



Şekil-4: BMP-7 ve TGF-β sinyal yolağı arasındaki etkileşim. 1) Bone morfojenetik proteinler tip II reseptöre bağlanır, BMPR-II BMPR-I ile bir araya gelerek heterodimer oluşturur. 2) BMPR-II BMPR-I'in kinaz parçasını fosforiller ve fosforillenmiş BMPR-I sırasıyla regülatör (düzenleyici) Smadları fosforiller (R-Smadlar: Smad1, Smad5 ve Smad 8) Bu basamak inhibitör Smadlarla bloke edilebilir. (I-Smadlar: Smad6 ve Smad7) 3) Fosforillenmiş R-Smadlar Smad4 ile heterodimer oluşturur ve nükleusa gelir ve burada nükleer bağlayıcı faktörle (NBF) birleşir. 4) Uygun DNA cevap elementi ile etkileşmeden önce 5) Hedef genin transkripsiyonunu uyarır ya da baskılar. Bu şekilde BMP-7'nin Smad6'nın ekspresyonunu artırarak hem kendi ekspresyonunu hem de transforming growth faktör-β (TGF-β)'ya yanıt olarak oluşan sinyal yolağına analog şekilde diğer hedef genlerin ekspresyonunu azaltır (114).

Erişkin sıçanlarda BMP-7 ekspresyonu daha çok toplayıcı tubullerde az miktarda ise glomerüller ve renal arterlerin adventisya tabakasında görülmektedir (115). Renal kortekste medulladan daha fazla olmak üzere BMP-7 'nin bağlandığı reseptörler mevcuttur. Ek olarak işaretlenmiş BMP-7 dışarıdan verildiğinde bu dokulara bağlanmış (117) , böylece BMP-7'nin tubuler epitelyum ve glomerül farklılaşmasının devamını sağlamada güçlü otokrin ve parakrin etkileri olduğu gösterilmiştir. Proksimal tubul, glomerülüs, ve toplayıcı tubullerde yüksek derecede özgünlük taşıyan BMP-7 tip II reseptörlerinin saptanması, BMP-7'nin bu alanlardaki özgün fizyolojik rolünü desteklemiştir (16).

Bosukanda ve arkadaşları tarafından radyoaktif işaretli BMP-7'nin sıçan böbreğindeki biyodağılım çalışmaları ile bu reseptörler tanımlanmıştır (117). Renal korteksteki tutulum medulladan belirgin olarak daha fazladır. İşaretli BMP-7'nin çoğunluğu renal kortekste, glomerül ve ona komşu kıvrımlı tubulde, medullada ise toplayıcı tubullerde tutulmuştur.

BMP-7, akut ve kronik böbrek yetmezliği modelinde böbrek fonksiyonunun devam ettirilmesini sağlayabilmektedir. Her iki modelde de BMP-7 tedavisi sürviyi ve tubuler interstisyumdaki nötrofil birikimini belirgin olarak azaltmak dahil histolojik parametreleri düzeltir. Veriler embriyonik böbrek oluşumunun tam olması için BMP-7 gerektiğini ve böbrek gelişiminde ve patofizyolojisinde BMP-7'nin farklılaşma ve devam faktörü olarak etki yaptığını göstermiştir (15). Bu sebeplerden dolayı BMP-7 eksikliğinin akut ve progresif renal hastalıkta önemli olabileceği düşünülmüş ve akut iskemik hasar, tubulointersitisyel fibrozis, diyabetik nefropati, lupus nefriti, renal osteodistrofi, vasküler kalsifikasyon gibi çok sayıdaki renal hastalıkta, hayvan modelinde BMP-7'nin rolü araştırılmıştır (16).

Akut iskemik renal hasar modelinde, BMP-7 ile tedavi edilen hayvanlarda renal fonksiyonda (serum kan üre nitrojeni ve kreatinin) ve sağkalımda düzelmeye; histokimyasal olarak ise tubuler nekroz ve doku infarktında azalma, intersellüler adezyon moleküllü-1 ekspresyonunda azalma, nötrofil infiltrasyonu ve aktivitesinde azalma, ve iyileşme döneminde apoptoziste azalma saptanmıştır (118).

Kemirgen hayvanlarda (rodent) unilateral obstruksiyon modelinde obstruksiyonla aynı anda başlanarak 5 gün süreyle verilen BMP-7'nin renal fonksiyonu koruduğu, tubuler atrofiyi önlediği ve obstruksiyondan sonraki ilk 5 gün içinde gelişen tubulointersitisyel inflamasyon ve fibrozisi azalttığı gösterilmiştir. BMP-7, apoptozunun uyarılmasını engelleyerek renal

tubuler epitelyal bütünlüğün devamını sağlamış ve epitelyal-mesenkimal transdiferansiyasyonu inhibe (15,119) etmiştir (17).

BMP-7'nin böbrekte tanımlanmış etkileri şöyle özetlenebilir:

1. BMP-7'nin TGF- β etkilerini antagonize eden Smad6'nın aktivasyonu yoluyla vasküler düz kas hücresi (120,121,122) ve mesengial hücreler üzerinde (123) TGF- β 'nin profibrojenik etkilerini bloke etmesi
2. Apoptozise uğrayan hücre sayısının azaltılması: Unilateral üreteral obstrüksiyonlu sıçan modelinde (119) ve iskeminin sebep olduğu akut renal yetmezlikli sıçanlarda (118) BMP-7 apoptozise uğrayan hücrelerin sayısını azaltmıştır.
3. Proinflamatuvar sitokin (TNF- α) ve kemokin salınımını azaltmak yoluyla başlangıçtaki hasarı takiben oluşan inflamatuvar kaskadın ve nihayetinde gelişen fibrozisin sınırlandırılması (124)
4. Endotelin (ET-2), HO1 (hemoksijenaz-1) ve ADORA1 (Adenozin reseptör A1) üzerindeki etkileri yoluyla renal kan akımının korunmasına yardım etmesi (124)

2.7. Interleukin-6

IL-6 çok çeşitli biyolojik aktiviteleri olan sitokinlerin bir başka tipik örneğidir (125). T hücreleri, B hücreleri, monositler, fibroblastlar, keratinositler, endotelyal hücreler, mesengial hücreler ve bazı tümör hücreleri gibi lenfoid ve lenfoid olmayan çeşitli hücre tiplerinde infeksiyon, travma süresince ve immunolojik uyarı durumlarında üretilir (125). IL-6'nın çok çeşitli fonksiyonel özelliklerinden dolayı bu sitokinin aktivitesini tanımlamak için interferon- β 2, hepatosit-uyarıcı faktör, sitotoksik T hücre differensiyasyon faktörü, B hücre differensiyasyon faktörü, nörotropin 2, B hücre uyarıcı faktör 3 gibi çeşitli isimler kullanılmıştır (126).

2.7.1. Yapısı

Hücre içi sinyal iletisi reseptörlerine bağlandıktan sonra gp130 ilişkili sitoplazmik tirozin kinazların (JAK1, JAK2, JAK3) aktivasyonu ve STAT1 ve STAT 3 ün fosforilasyonu yoluyla gerçekleşir. (94; 23, 26)

2.7.2. Biyolojik etkileri:

IL-6, IL-2 reseptör ekspresyonunu ve IL-2 üretimini arttırmak yoluyla T hücre büyümesini ve sitotoksik T lenfositlerinin differansiyasyonunu indükler (129). IL-6'nın diğer biyolojik etkileri (129,130,131,132,133) Tablo-5'de özetlenmiştir.

2.7.3. IL-6 ve böbrek:

IL-6'nın glomerüler hücreler üzerinde proliferatif etkileri olabileceği, insan IL-6 genomik genini taşıyan transgenik farelerde, ciddi mesengial proliferasyon ve matriks genişlemesinin saptanması ile gösterilmiş (134,135) ve bu modelde fazla IL-6 üretimi membranoproliferatif glomerülonefrit (MPGN) oluşmasına sebep olmuştur. İn vivo ve in vitro çalışmalar IL-6'nın mesengial hücre proliferasyonunun otokrin bir düzenleyicisi olduğunu desteklemiştir (136). Mesengial hücreler tarafından IL 6 üretimi, bazı proinflamatuvar sitokinler (TNF-alfa, PDGF, IL-1..vs) ve bakteriyel lipopolisakkaritler ile artırılır; fakat tip I kollajen gibi ekstrasellüler matriks komponentleri tarafından azaltılır (136,137).

Tablo-5: Interleukin-6'nın etkileri (133)

Hematolojik
Multipotent hematopoetik progenitörlerin proliferasyonu
Myelom ve plasmositomda hücre büyümesi
İmmunolojik
B hücrelerinin differansasyonu ve maturasyonu(B-hücre-stimulating factor-2)
B hücrelerinden immünglobulin üretimi
T hücrelerinin proliferasyonu ve differansasyonu
Hepatik
Hepatosit stimülasyonu
Akut faz yanıtının çeşitli genlerinin indüksiyonu(C-reaktif protein, haptoglobulin,
fibrinojen)
Nörolojik
Sinir hücre differansasyonu
Gliosis(transgenik farelerde)
Kardiyak
Miyokardiyal hipertrofi
Endokrin
Termogenezisin stimülasyonu(endojen pirojen)
Hipotalamik-pitüiter-adrenal aksın stimülasyonu
Vasopressin sekresyonunun stimülasyonu
Growth hormon sekresyonunun stimülasyonu
Tiroid aksının supresyonu
Serum lipid düzeyinin supresyonu
Osteoporozis(postmenapozal ya da hipogonadizmden dolayı)

2.7.4. IL-6 ve Angiotensin II ilişkisi

Ang II, mesengial ve düz kas hücre kültürlerinde IL-6'nın salınımını ve mRNA ekspresyonunu artırır (138,139). Ortega ve arkadaşları, Ang II infüzyonunun sıçanlarda IL-6 üretiminin arttırdığını, mesengial hücreler ağırlıkta olmak üzere glomerüler hücrelerde, tubuler hücrelerde, ve renal arterlerde (ana olarak vasküler düz kas hücreleri) IL-6 eksprese edildiğini, böylece Ang II'nin in vivo olarak IL-6 üretimini arttırdığını gösterilmişlerdir. Anti IL-6 reseptör antikolarıyla IL-6 sinyalinin blokajı Ang II'nin tetiklediği hücre proliferasyonunu azaltır (138).

2.8. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF-A ya da VEGF) eskiden vaskulotropin ya da vascular permeabilite faktörü (VPF) olarak da adlandırılan, VEGF-B,-C,-D, -E ve plasenta growth faktörü içeren multipotent sitokin ailesine mensuptur (140). Anterior hipofizin folliküler hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, mesengiyal hücreler, monositler, fibroblastlar, keratinositler, osteoblastlar, astrositler, tümör hücreleri gibi pek çok hücre tipinde VEGF üretilir (141).

2.8.1. Yapısı:

İnsanda içerdikleri aminoasit sayılarına göre farklı, en az 6 izoformu vardır VEGF 121, VEGF 165 ve VEGF 189 en çok eksprese edilen isoformdur (140). VEGF reseptör-1 (Flt-1) ve VEGF reseptör-2 (Flk-1) adında 2 adet (141) yüksek affiniteli transmembran tirozin kinaz reseptörü vardır (140). VEGF bir çok etkisine VEGF-R2 aracılık eder (142).

2.8.2. Biyolojik etkileri:

VEGF, endotelial hücrelerde endotelial nitrik oksit sentaz (NOS3) ekspresyonunu ve nitrik oksit üretimini artırır. Nitrik oksit de negatif geri döngü mekanizması ile VEGF üretimini azaltır. VEGF'nin biyolojik etkilerini nitrik oksit aracılığıyla gerçekleştirdiğini gösteren çok sayıda çalışma vardır (140).

Hipoksi VEGF ekspresyonu ve/veya üretimi için ana stimulustur. Ayrıca, epidermal growth faktör, insülin-like growth faktör (IGF-1), TGF- β , PDGF, , angiotensin II, IL-1 ve IL-6 gibi

büyüme faktörleri ve sitokinler de VEGF ekspresyonunu artırırlar. VEGF ayrıca prostoglandinler, mekanik stres, hiperglisemi, ileri glikozillenmiş son ürünler(AGE) , protein kinaz C (PKC) ve reaktif oksijen türleri (ROS) ile de indüklenebilir (140).

VEGF endotelial hücre proliferasyonunu ve differansiyasyonunu stimüle eder, vasküler geçirgenliği artırır, endotelium-bağımlı vazodilatasyona aracılık eder, endotelial apoptozisi önlemek yoluyla vasküler sağkalımı destekler. Ek olarak VEGF plasminojen aktivatör, plasminojen aktivatör inhibitör-1, interstisyel kollajenaz gibi matriks yeniden yapılanmasında önemli faktörleri uyarır, monosit kemotaksisini ve adezyon molekülleri ekspresyonunu artırır (140).

2.8.3. VEGF ve böbrek

Kemirgen hayvanlarda ve insan böbreğinde, VEGF mRNA'sı ve/veya proteini baskın olarak glomerüler podositlerde, distal tubullerde ve toplayıcı duktuslarda ve daha az miktarda bazı proksimal tubullerde saptanır. İnsan böbreğinde, VEGFR1 ve VEGFR 2, baskın olarak preglomerüler, glomerüler, ve peritubuler endotelial hücrelerde bulunur. Filtrasyon bariyerindeki stratejik lokalizasyonu ve mikrovasküler geçirgenliği arttıran etkileri, VEGF'nin normal erişkin böbreğinde glomerüler geçirgenliği kontrol ettiği ve patolojik durumlarda proteinüriyi indüklediği yorumuna yol açmıştır (140).

Tubuler hücreler, hipoksi ya da hasara, VEGF üretimi ile yanıt verirler; VEGF, peritubuler kapillerlerin proliferasyonunu stimüle ederek tubuler hasarı onarır (140); bu sebeple VEGF'nin doku iskemi süresince endotel hücreleri için proliferatif 'sağkalımcı faktör' olduğu kabul edilir (143,144).

VEGF normal nefrogenezis için de önemli bir faktördür (144). In vivo nötralize antikörlerle VEGF aktivitesinin supresyonu, glomerülogenezisi ciddi şekilde kesintiye uğratar. VEGF'in olmadığı ortamda, tipik olarak endotelial hücrelerin olmadığı, anormal bir glomerül yapısı vardır; glomerülün kapiller lümeni tam olarak kaybolmuştur ya da gelişim süresince yetersizdir. VEGF sisteminin bir çok nefropati tipinde etkilendiği gösterilmiş olup (145) VEGF'ü manipüle eden girişimlerin terapötik açıdan faydalı olabileceği öne sürülmüştür (140).

2.9. Renin angiotensin sistemi (RAS)

Renin angiotensin sistemi (RAS), vasküler tonus, sıvı ve elektrolit dengesi ve sempatik sinir sistemi üzerindeki etkileriyle kardiyovasküler homeostazda rol oynayan bir enzim kaskadıdır. (146) Vücutta angiotensin üreten 2 sistem vardır (29).

2.9.1. Hormonal RAS:

Dolaşımdaki renin, angiotensinogenin angiotensin I'e dönüşümünü katalize eder. Angiotensin geni karaciğerde eksprese edilir ve sentezlenerek dolaşıma salınır. Renin aktivitesiyle oluşturulan angiotensin I vasoinaktif bir decapeptiddir. Angiotensin-I in Angiotensin-II ye dönüşümü RAS yolağındaki anahtar reaksiyondur; ve güçlü bir vazokonstrüktör olan Ang II'yi oluşturur. Reaksiyon dipeptidil karboksilaz fonksiyonuna sahip çinkolu bir metallopeptidaz olan angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından katalizlenir (147). Hormonal fonksiyon yapan asıl angiotensin, angiotensin II (Ang II)'dir ve angiotensin dendiğinde de bu madde anlaşılır (29).

2.9.2. Doku renin angiotensin sistemi(DRAS):

Bu sistem normal şartlarda plazmadan aldığı böbrek kaynaklı renini kullanır (29). Doku RAS'nin anahtar komponenti tıpkı dolaşımdaki RAS gibi ACE'dir. DRAS damar, kalp, böbrek ve beyinde bulunur; bu dokularda DRAS ile üretilen angiotensin II, otokrin, parakrin ve intrakrin etkilere aracılık eder (146). DRAS en yoğun şekilde böbrekte bulunur ve böbrek damar yatağı rezistansının uzun vadeli düzenlenmesine katkıda bulunarak (29) glomerüler filtrasyonu etkiler (148).

Aşağıda gerek dolaşan gerekse doku RAS sistemini oluşturan renin, anjiotensin ve anjiotensin dönüştürücü enzimin temel özellikleri özetlenmiştir.

2.9.3. Renin:

Renin bir asit proteaz türüdür (149). Böbreklerde, renin, afferent ve efferent arteriollerin glomerüle girip çıktıkları kavşakta yerleşmiş bir hücre kompleksi olan jukstaglomerüler aygıtta (29) sentezlenir, depolanır ve dolaşıma salınır (147).

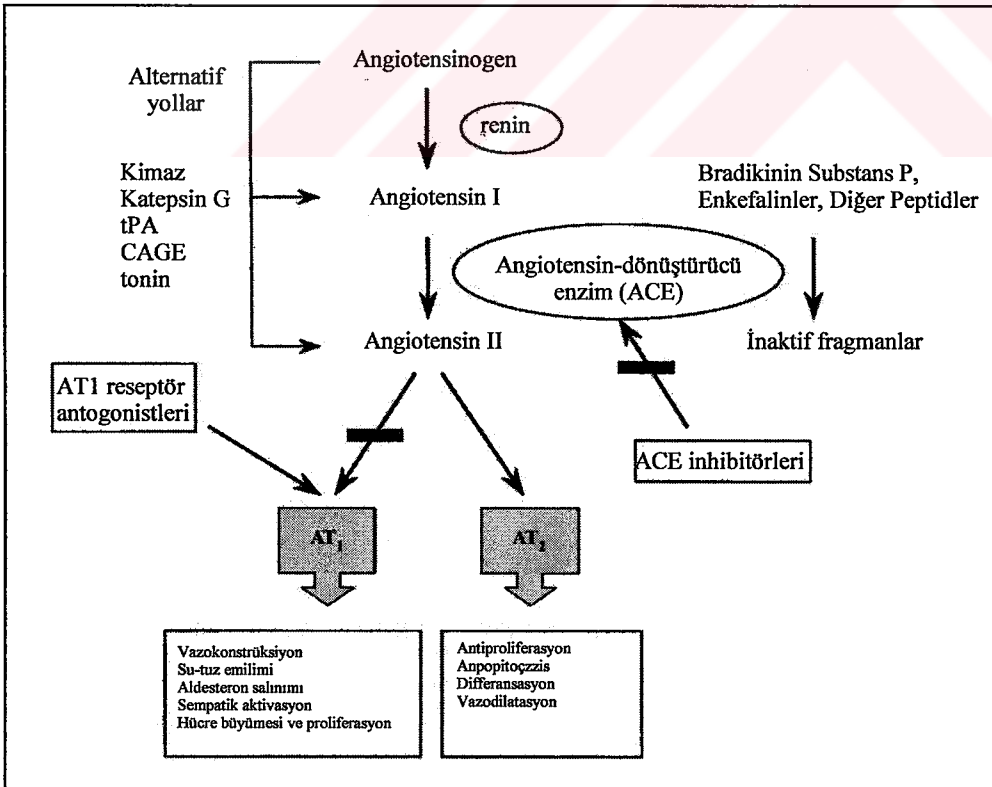
Böbreğin renin sekresyonunun denetlenmesinde, distal tubuluslardaki NaCl düzeyine duyarlı özelleşmiş bir hücre grubundan oluşan makula densa önemli rol oynar. Distal

tubulusa ulaşan NaCl miktarındaki artış bu hücre grubunu uyararak negatif geri bildirim ile, jukstaglomerüler hücrelerin negatif geri bildirim denetimini aktifleştirir, ve renin üretimi inhibe olur (147).

2.9.4. Angiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE)

Angiotensinojen karaciğerde sentez edilerek dolaşıma salınır (147). Angiotensinojen üzerine reninin etkisi sonucu (29), vasokonstriktif özelliği olmayan (147) angiotensin I (Ang I) oluşur. Ang I'in güçlü vasokonstriktif özelliğe sahip Ang II'ye dönüşümü, RAS yolağının anahtar reaksiyonudur. Bu reaksiyon, angiotensin dönüştürücü enzim (ACE; kininaz II) tarafından katalize edilir (29). Aktivitesi görece düşük olan Ang I'in aktivitesi, ACE ile Ang II'ye dönüşünce 100 kat artar (150). Şekil-5'te RAS kaskadı görülmektedir.

Dönüştürücü enzim, damar endotel hücrelerinde üretilir. Kapiller damarlardan zengin bir organ olan akciğerde fazla miktarda (29); ayrıca böbrekler, beyin, adrenal bezler, overler ve muhtemelen diğer dokularda da bulunmaktadır (151). Böbrekte glomerüllerin endotelinde, jukstaglomerüler apparatta ve ayrıca proksimal tubulusların apikal yüzünde de bulunur (29).



Şekil-5: Renin-angiotensin sisteminin biyoenzimik kaskadı (146)

ACE ayrıca bradikinin C ucundan iki aminoasiti (fenilalanin-arjinin) kopararak onu inaktive eder (29). Böylece ACE enzimatik aktivitesi iki etkiyle sonuçlanır: Vasokonstrüktör/pressor bir ajanın (Ang II) aktivasyonu ve vasodilatatör bir ajanın (bradikinin) inaktivasyonu (147).

2.9.5. Angiotensin II reseptörleri

Ang II tip1 (AT1) ve tip2 (AT2) Ang II reseptörüne bağlanmak suretiyle etkisini gösterir. (29,147) İki reseptör tipinin uyarılmalarıyla oluşan farklı etkiler Tablo-6'da gösterilmiştir.

Tablo-6: AT1 ve AT2 reseptörlerin aracılığı ile oluşan anjiotensin etkileri (29,152)

AT1 reseptörler

Kan basıncı yükselmesi(vasokonstruksiyon)
Aldesteron salgılanması
(sodyum tutulması ve potasyum kaybı)
Renin salgılanmasının baskılanması
(negatif feedback kontrol)
Miyokard ve damar düz kas hipertrofisi
Tuz iştahı artması ve vasopressin salgılanması
Sempatik sinir sistemi uyarılması
Endotelin sentez/ salıverilmesinde artma
Damar ve miyokarda fibrozis
Miyokardiyal kontraktilitede artma
Aritmileri indükleme
Plasminojen aktivatör inhibitör-1 uyarılması
Superoksit oluşumunun uyarılması

AT2 reseptörler

Antimitojenik etki (myokard ve damar düz
kas hücresi proliferasyonunun engellenmesi)
Hücre farklılaşması ve apoptozis
Doku onarımı
Fetusta böbrek ve idrar yolu gelişmesi
Vasodilatasyon(muhtemelen nitrik oksit aracılığıyla)
Basınc/natriüresis kontrolü
Böbrekte prostoglandinlerin,bradikininin ve nitrik
oksit uyarılması

2.9.6. Angiotensin II'nin Biyolojik Etkileri

Angiotensin, bilinen en güçlü vasokonstrüktörlerden biridir (29). Damar düz kas hücrelerinde kasılmaya yol açarak periferik damar direncini ve sistemik kan basıncını artırır (29,146). Ang II kardiyak miyositler, fibroblastlar ve vasküler düz kas hücreleri üzerinde hücre büyümesi ve proliferasyonuna aracılık eder. Ang II fibroblast büyüme faktörü, TGF- β 1, PDGF gibi çeşitli endojen büyüme faktörlerinin ekspresyonunu ve salınımını indükler (146).

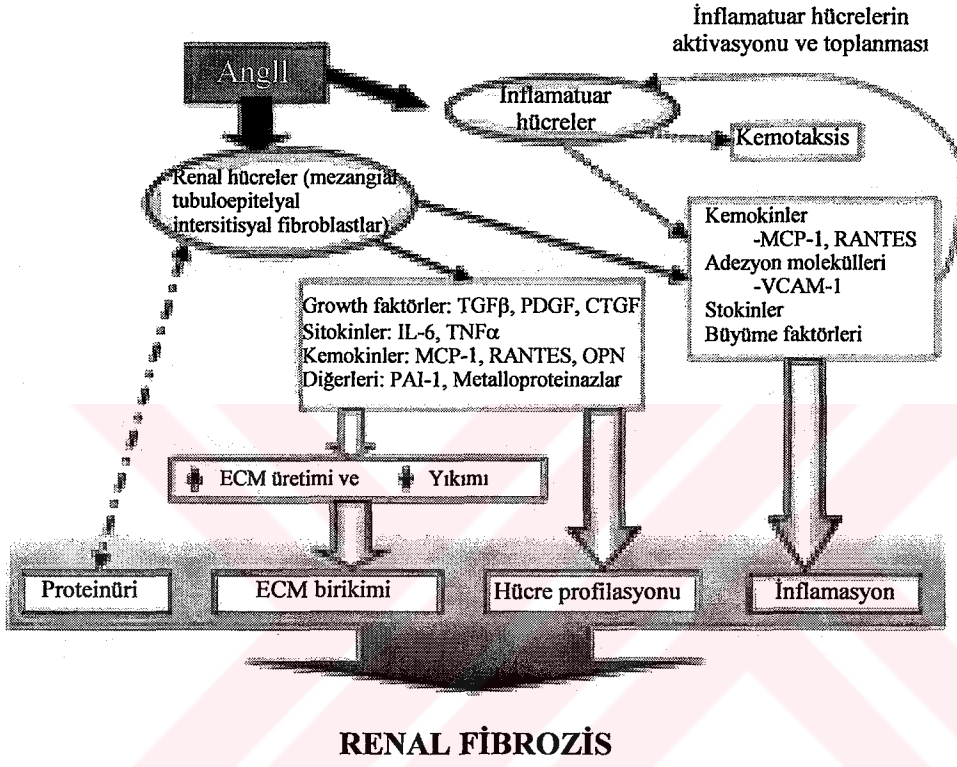
Ang II adrenal bezde zona glomerulosa'ya etki ederek, aldosteron biyosentezini ve sekresyonunu uyarır; aldosteron üretiminde bu mekanizma en önemli yoldur. Böylece sodyum ve su dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Ang II ile uyarılan mimeralkortikoid salınımı, Na emilimini artırırken, potasyum atılımını da artırır. Ang II adrenal medulladan katekolamin salınımını da stimüle eder (146)

Böbrekteki afferent ve efferent arterioller, angiotensininin büzücü etkisine en duyarlı olan damar segmentidir. Intravenöz olarak uygulanan Ang II , diğer damar yataklarını etkilemeyen ve kan basıncını yükseltmeyen dozlarda bile renal kan akımı, glomerüler filtrasyon hızı ve sodyum itrahında belirgin azalma yapar. Efferent arterioller angiotensine afferent arteriollerden daha duyarlıdır (29). Renal Ang II böbrekte proksimal tubulde sodyum ve su reabsorbsiyonunu düzenler ve macula densa hücrelerinden renin sekresyonunu inhibe eder. (146).

2.9.7. Angiotensin II ve renal fibröz

Ang II, hücre tipine bağımlı olarak hiperplazi ve hipertrofiyi indükleyen renal büyüme faktörü olarak da etki gösterir. Bu vasoaktif peptid, mesengial ve tubular hücreleri ve intersitisyel fibroblastları, aktive ederek fibronektin, laminin ve kollagen gibi ECM proteinlerinin ekspresyonunu ve sentezini artırır (153). Bu etkilerden bazılarını TGF- β gibi diğer büyüme faktörlerinin salınımı aracılık eder. Ang II etkilerinin ACE inhibitörleri ve angiotensin tip I (AT1) antagonistleri ile bloke edilmesi, proteinüriyi, TGF- β gibi sitokinlerin gen ekspresyonunu, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve fibrozisi önlemektedir (24,25,26). Ang II, ayrıca, mononükleer hücreleri aktive eder, ve proinflamatuvar mediyatörleri (sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri, nükleer faktör-kB) artırır (153).

Ayrıca Ang II matriks degradasyonunu da denetler. Bu veriler bu vasoaktif peptidi kontrol eden ilaçların progresif renal hastalıklardaki fibrozisi engellemede en iyi yollardan biri olabileceğini düşündürmektedir (153).



Şekil-6: Ang II'nin indüklediği renal fibroziste hücreler ve mediyatörler.

Ang II inflammatuar hücreler için kemotaktik bir faktördür ve hem yerli hem de infiltre eden hücrelerde kemokin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Bu inflammatuar cevap MCP-1 ve TGF- β üretimi ile doğrudan olarak makrofaj-ilişkili faktörler aracılığıyla yerli hücrelerin aktivasyonu ile dolaylı olarak fibrozisin ilerlemesine katkıda bulunabilir. Renal hücrelerde Ang II hücre büyümesi ve matriks regulasyonu ile ilgili proteinleri artırır. Proteinürü renal RAS'ı aktive edebilir ve böylece renal hasara katkıda bulunur (153).

2.10. Angiotensin Konverting Enzim İnhibitörleri (ACEİ)

2.10.1. Yapısı ve etki mekanizması:

ACE'yi yarışmalı olarak inhibe ederek vasokonstriktör Ang II'nin üretimini engellerler (154). Böylece plazma ve dokularda Ang II düzeyini azaltarak hem arteriyel ve venöz vasodilatasyona hem de natriürezise sebep olurlar (29,154). Ang II oluşumunun inhibisyonu ile ACEİ, dolaylı olarak, aldosteron sekresyonunu azaltırlar, böylece hafif natriürezis ve potasyum sekresyonunda azalma meydana getirirler. Ek olarak vasodilatatör bradikininlerin düzeyini arttırlar (154). Kaptopril, enalapril, benazepril, fosinopril, kinapril, lisinopril, perindopril, ramipril, silazapril ve trandolapril gibi çok sayıda ACEİ ilaç üretilmiştir. ACEİ'nin etkileri birbirine oldukça benzer, farkları özellikle farmakokinetik özelliklerinden kaynaklanır (29).

2.10.2. Etkileri:

Antihipertansif etkilerinin yanısıra, antiproteinürik etkileri özellikle proteinüri ile giden nefropatilerde (diyabetik nefropati, glomerulonefritler) kullanımlarını sağlamıştır. Antiproteinürik etkilerini glomerüler içi basıncı düşürerek hemodinamik yol ile glomerül membranının geçirgenliğinin seçiciliğini arttırarak gösterirler. ACEİ Ang II oluşumuna engel olarak antifibrotik etki de gösterirler (29,154).

2.10.3. Yan etkileri:

ACEİ'nin başlıca yan etkisi, özellikle bilateral renal arter stenozu olan hastalarda ciddi hipotansiyona ve takiben akut böbrek yetmezliğine sebep olabilmeleridir. Hiperkalemi intrinsik renal hastalığı ve tip IV renal tubuler asidozu olan (sıklıkla diabetikler) larda ve yaşlılarda gelişebilir (155).

Ayrıca öksürük (150), tat bozukluğu, trombositopeni, nötropeni ve agranülositoza, (150,154) ve nadiren döküntü, ürtiker ve angionörotik ödem gibi hipersensivite reaksiyonuna sebep olabilirler. Grubun hiçbir üyesi gebelikte kullanılmaz.(150).

2.10.4. Atılımı:

Çoğu ACEI böbrekten atılır, Fosinopril % 50'si karaciğerde metabolize edilen tek ilaçtır; renal yetmezlikte bu oran artar (154).

2.11. Angiotensin II reseptör antagonistleri (Sartanlar)

2.11.1. Yapısı ve etki mekanizması:

Angiotensin II reseptör antagonistleri olan sartanlar, angiotensin II tip 1 (AT1) reseptörüne bağlanarak, angiotensin II'nin bu reseptörlere bağlanmasını ve bu yolla da etkilerini bloke ederler (29).

2.11.2. Etkileri:

Ana etkisi Ang II'nin AT1 reseptör aracılığıyla gerçekleştirdiği etkilerin bloke edilmesidir. Kanda renin düzeyini ve ayrıca ACEI'den farklı olarak angiotensin II düzeylerini artırırlar; bunun nedeni böbrekte renin salgılayan hücreler üzerinde Ang II nin AT1 reseptör aracılığıyla yaptığı baskıyı (feedback inhibisyonu) ortadan kaldırmalarıdır (29).

2.11.3. Yan etkileri:

Baş dönmesi, semptomatik hipotansiyon, tat duyusunda bozulma (29,150), angioödem, allerjik reaksiyon ve döküntüdür (154). Hiperkalemi yapabilir. Bilateral renal arter stenozu olan hastalarda hipotansiyon ve renal yetmezlik ve hiperkalemiye sebep olabilir (155).

2.11.4. Atılımı:

Absorbsiyonu besinlerle değişmez. Plasma proteinlerine yüksek oranda bağlanırlar. (%99) Böbrekten salgılanmak ve karaciğerden safraya itrah şeklinde elimine edilirler (29).

3. MATERYAL-METOD:

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Hayvan Deneylemleri Araştırma Laboratuvarında, Temmuz 2004 ve Ekim 2004 tarihleri arasında gerçekleştirilmiş, deneysel, prospektif, randomize bir çalışma olup, çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvan Araştırma Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

3.1. Çalışmada kullanılan hayvanlar:

Çalışmada, Marmara Üniversitesi Hayvan araştırma laboratuvarından temin edilen Wistar cinsi, ortalama ağırlıkları 300-350 gr olan erkek ve dişi sıçanlar kullanılmıştır. Laboratuvar sıçanı ile ilgili genel bilgiler tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 7: Laboratuvar sıçanı ile ilgili genel bilgiler

Yaşam süresi	2,5-3,5 yıl
Ortalama vücut ağırlığı	Erkek: 450-520 gr. Dişi:250-300 gr
Meme bezleri	6 çift
Gıda alımı	5-6 gr/ 100 gr vücut ağırlığı/ gün
Su alımı	10-12 ml/ 100 gr vücut ağırlığı/ gün
GİS transit zamanı	12-24 saat
İdrar hacmi	5.5 ml/ 100 gr vücut ağırlığı/ gün
Ortalama rektal ısı	38 C (36-39.5)
Ortalama solunum hızı	92/ dk(80-100)
Ortalama lalp hızı	350/ dk(260-450)
Ortalama kan basıncı	116/ 90 mmHg
Total vücut sıvısı	167 ml
Plasma hacmi	7.8 ml

3.2. Çalışma grupları

Çalışmanın başında bir hafta boyunca tuzdan fakir diyetle beslenen 32 sıçan, bu sürenin sonunda her grupta sekizer adet olacak şekilde toplam dört gruba ayrılmıştır. Uygun ısı ve sıcaklığın sağlandığı kafeslerde dörtlü gruplar halinde bulunan sıçanların çalışma süresi boyunca suya erişimleri kısıtlanmamıştır.

Grup 1: Kontrol grubu.

Bu gruptaki hayvanlara çalışma boyunca 0.5 cc. serum fizyolojik (SF), intraperitoneal enjeksiyon halinde, 28 gün süreyle uygulanmıştır. Çalışmanın başında ve sonunda; kan ve idrar örnekleri toplanmıştır.

Grup 2: Tacrolimus 1 mg/ kg alan grup.

Bu gruptaki hayvanlara çalışma boyunca her gün Tacrolimus, 1 mg/ kg dozunda, 28 gün süreyle, intraperitoneal enjeksiyon halinde uygulanmıştır.

Grup 3: Tacrolimus 1 mg/ kg + Kinapril 10 mg/ kg alan grup.

Bu gruptaki hayvanlara Grup 2'de anlatıldığı şekilde Tacrolimus ve beraberinde Kinapril, 10 mg/ kg dozunda, 28 gün süreyle peroral olarak uygulanmıştır.

Grup 4: Tacrolimus 1 mg/ kg + Valsartan 40 mg/ kg

Bu gruptaki hayvanlara Grup 2'de anlatıldığı şekilde Tacrolimus ve beraberinde Valsartan 40 mg/ kg dozunda, 28 gün süreyle peroral olarak uygulanmıştır.

3.3. İlaçların hazırlanması ve uygulanması:

Tacrolimus:

Tacrolimus ampul (20 mg) hayvan kullanımı için özel olarak üretilmiş 1 cc'lik ampül formu (Fujisawa, Japan) 10cc steril distile su ile sulandırılarak 1 cc solusyon içinde 2 mg Tacrolimus olacak şekilde hazırlanmıştır. Her uygulama öncesinde hayvanlar tartılarak, Tacrolimus dozu 1 mg/kg olacak şekilde insülin enjektörü ile, karın ön yüzünden intraperitoneal enjeksiyon halinde uygulanmıştır.

Kinapril:

Aquitel®20 mgr (Pfizer) Film tablet, 4 cc steril distile su ile çözülerek 1 cc solusyon içinde 5 mg. Kinapril dozu elde edilmiştir. Her uygulama öncesinde hayvanlar tartılmıştır ve Kinapril dozu 10 mg/ kg olacak biçimde, hayvanlar işlem öncesinde eter anestezisi ile uyutulduktan sonra pediatrik boy feding tüp kullanılarak, orogastrik olarak uygulanmıştır. Çalışma süresi boyunca, sodyumdan fakir (%0.05) diyetle beslenen hayvanların çalışma boyunca günlük kilo takibi yapılarak, gelişebilecek yan etkiler açısından yakından takip edilmişlerdir.

Valsartan:

Diovan®80 mgr (Novartis) film tablet 8 cc steril distile su ile çözülerek 1 cc solusyon içinde 8 mgr Valsartan dozu elde edilmiştir. Her uygulama öncesinde hayvanlar tartılmıştır ve Valsartan dozu 40 mg/ kg olacak biçimde, hayvanlar işlem öncesinde eter anestezisi ile uyutulduktan sonra pediatrik boy feding tüp kullanılarak, orogastrik olarak ilaç uygulanmıştır. Çalışma süresi boyunca, sodyumdan fakir (%0.05) diyetle beslenen hayvanların çalışma boyunca günlük kilo takibi yapılarak, gelişebilecek yan etkiler açısından yakından takip edilmişlerdir.

3.4. Örneklerin toplanması:

Yirmi sekiz günlük çalışma süresinin sonunda, tüm gruptaki sıçanlar, 24 saatlik idrarlarının toplanması amacıyla, her kafeste bir adet sıçan olacak şekilde metabolik kafeslere yerleştirilmişlerdir. Yirmidört saat boyunca suya erişimleri kısıtlanmayan sıçanlar, bu dönem içinde aç bırakılmışlardır. İdrarlar toplandıktan sonra miktarları ölçülerek, fonksiyonel parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla saklanmıştır. Yirmidört saatlik idrarları toplandıktan sonra, eter anestezisi uygulanan sıçanlardan, 5 cc'lik enjektörler kullanılarak, ortalama 3,5-4 cc kan örneği intrakardiyak olarak alınmıştır. Daha sonra karın orta hattan yapılan insizyonla batin içine girilerek her iki böbrek çıkartılmıştır. Dokular tartıldıktan sonra formol içine konularak, ışık mikroskopisi ve immünhistokimya değerlendirilmesi amacıyla, MÜTFH Patoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir.

3.5. Deęerlendirilecek Parametreler:

- a) Kilo
- b) İdrar örnekleri: Alınan 24 saatlik idrar örneklerinin miktarı ve kreatinin düzeyleri değerlendirilmiştir.
- c) Serum örnekleri: Alınan serum örneklerinden, BUN, kreatinin, glukoz, elektrolit ve Tacrolimus düzeyi ölçümleri yapılmıştır.
- d) Doku örnekleri: Alınan doku örneklerinde, renal histopatoloji ve immunhistokimya değerlendirilmeleri yapılmıştır.

3.6. Örneklerin değerlendirilmesi:

3.6.1. Fonksiyonel Çalışmalar:

- a) Serum ve idrar elektrolit düzeylerinin ölçülmesi:
Serum ve idrarda BUN, kreatinin ve elektrolit ölçümleri, MÜTFH Merkez Biyokimya laboratuvarında spektrofotometri yöntemiyle 917 Hitachi Otoanalizör kullanılarak yapılmıştır. (Boehringer Mannheim System, 917 Hitachi otoanalizör-Roche)
- b) Serum Tacrolimus düzeyi ölçümü:
Serum Tacrolimus düzeyi ölçümü MÜTFH Farmakoloji Bölümü'nde, Tacrolimus II ref 3C10 34-3091/R6 IMX System (Abbott Laboratories, USA) KİT'i kullanılarak Radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle değerlendirilmiştir.
- c) İdrarda protein miktarının ölçümü: Tüm gruplarda, 24 saatlik idrarda protein miktarı, 917 Hitachi otoanalizör kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.
- d) Renal kreatinin klirensi standart $Ccr : U * V / P$ formülüne göre hesaplanmıştır. (U: İdrardaki kreatinin konsantrasyonu, P: Plazmadaki kreatinin konsantrasyonu, V: İdrar akım hızı)

3.6.2. Histolojik çalışmalar.

Böbrek, karaciğer ve kalp dokuları, formol içine konulduktan sonra histopatoloji ve immünohistokimya değerlendirilmesi için Marmara Üniversitesi Patoloji Laboratuvarına gönderilmiştir. Dokular uygun olarak dehidrate edildikten sonra, böbrek kesitleri parafinize edilerek Hematoksilen –Eozin (HE), peryodik asit-Schiff(PAS) ve Mason Trikrom boyaları ile boyanmıştır.

a) Hematoksilen-Eozin (HE):

HE ile boyamayla ön planda glomerül hasarı ve intersitisyum değerlendirilmiştir. Bunun için ışık mikroskobunda 100 büyütmeyle 10 alan sayılarak mononükleer hücre infiltrasyonu, hücre ödemi, vakuolleşme, tubul düzensizliği, ve tubul bazal membranı kalınlaşması açısından kesitler değerlendirilmiştir.

Boyama yöntemi:

Kesitler 60 derecede, bir saat deparafinize edildikten sonra hidrate edilmiştir. Beş dakika Hematoksilen ile muamele edildikten sonra bol su ile yıkanarak %70'lik alkolde 30 saniye bekletilmiş ve 1 dakika Eosin boyasıyla muamele edilmiştir. Ardından tekrar dehidrate edilen kesitler, xylene'e alındıktan sonra kapatılmıştır.

b) Peryodik asit-Schiff(PAS):

PAS yöntemiyle boyamada arteriolopati değerlendirilmiştir. Arteriol hasarında hyalen birikimler, düz kas hücre nekrozu, mukoid subendotelyal genişleme, arteriol duvarında daralma değerlendirilmiştir. (Bu hasar ön planda, glomerüle yakın olan afferent arteriol alanında tespit edilir. Etkilenen alanda, hücre stoplazmaları içinde eozinofilik, PAS(+), homojen ve granüler birikimler saptanır.) Işık mikroskopunda 100 büyütmeyle, 50 glomerül alanı sayılmıştır. Sonuç olarak hyalen değişiklik gösteren arteriol sayısı, toplam arteriol sayısına oranlanarak ortalama değer elde edilmiştir. Her kesitteki hyalen arteriolopati derecesi semikantitatif olarak belirtilmiştir. (0= hyalinozis yok. 1: hafif hyalen değişiklikler, 2: belirgin hyalen değişiklikler) (156).

Boyama yöntemi:

Kesitler 60 derecede 1 saat deparafinize edildikten sonra hidrate edilmiş ve % 0.5'lik peryodik asitte 5 dakika muamele edilmiştir. Daha sonra distile su ile yıkanarak 15 dakika Schiff bazı ile muamele edilen kesitler, 10 dakika su ile yıkanmıştır. Sonrasında 5 dakika Mayer Hemotoksilen ile muamele edilen kesitler bol suyla yıkanmış ve dehidrate edilerek, xylene'e alınarak kapatılmıştır.

c) Mason Trikrom:

Mason Trikrom yöntemiyle intersitisyel fibrozis değerlendirilmiştir. Bu amaçla ışık mikroskopunda 100 büyütmeyle 10 alan sayılmış ve semikantitatif olarak, fibrozis görülen alan, toplam alana oranlanarak değerlendirilmiştir.

Derecelendirme: (157)

Normal intersitisyum=0

%5'in altında fibrotik alan: 0.5

%5-15 arasında fibrotik alan: 1

%16-25 arasında fibrotik alan: 1.5

%26-35 arasında fibrotik alan: 2

%36-45 arasında fibrotik alan: 2.5

%45'in üzerinde fibrotik alan: 3

Boyama yöntemi:

Kesitler, 60 derecede bir saat deparafinize edildikten sonra hidrate edilmiş ve Bouin solusyonunda 56 derecede bir saat bekletilmiştir. Bol su ile yıkandıktan sonra Weigert Hematoksilen ile 10 dakika muamele edilmiş ve tekrar bol su ile yıkanmıştır. Ardından 30 dakika Trikrom solusyonunda bekletilen kesitler %0.5 Asetik asit ile diferansiye edilmiştir. Bol su ile yıkandıktan sonra dehidrate edilen kesitler, xylene'e alınarak kapatılmıştır.

3.6.3.İmmünohistokimyasal Değerlendirme:

Deney hayvanlarının böbreklerinden hazırlanan kesitlerde , glomerüller ve intersitisyel alandaki TGF- β , PDGF, VEGF, IL-6 ve BMP-7 ekspresyonu immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir.

TGF- β 1: TGF- β 1 immünekspresyonu, 10 glomerül içeren kortikomedüller alanda, ışık mikroskobu ile 100 büyütmede, glomerül ve tubullerde, semikantitatif yoğunluk ve dağılım olarak değerlendirilmiştir. (1: hafif ekspresyon, 2: orta ekspresyon, 2: yüksek ekspresyon)

PDGF B: PDGF immünekspresyonu, 10 glomerül içeren kortikomedüller alanda, ışık mikroskobu ile 100 büyütmede, glomerül ve tubullerde, semikantitatif yoğunluk ve dağılım olarak değerlendirilmiştir. (1: hafif ekspresyon, 2: orta ekspresyon, 2: yüksek ekspresyon)

VEGF: VEGF immünekspresyonu, 10 glomerül içeren kortikomedüller alanda, ışık mikroskobu ile 100 büyütmede, glomerül ve tubullerde, semikantitatif yoğunluk ve dağılım olarak değerlendirilmiştir. (1: hafif ekspresyon, 2: orta ekspresyon, 2: yüksek ekspresyon)

BMP-7: BMP-7 immünekspresyonu 10 glomerül içeren kortikomedüller alanda, ışık mikroskobu ile 100 büyütmede, glomerül ve tubullerde, semikantitatif yoğunluk ve dağılım olarak değerlendirilmiştir. (1: hafif ekspresyon, 2: orta ekspresyon, 2: yüksek ekspresyon)

IL-6: IL-6 immünekspresyonu 10 glomerül içeren kortikomedüller alanda, ışık mikroskobu ile 100 büyütmede, glomerül ve tubullerde, semikantitatif yoğunluk ve dağılım olarak değerlendirilmiştir. (1: hafif ekspresyon, 2: orta ekspresyon, 2: yüksek ekspresyon)

Boyama yöntemi:

VEGF, BMP 7, TGF β , IL-6, PDEGF ekspresyonunu göstermek için streptavidin biotin complex / horseradish peroxidase (Str.ABC/HRP) yöntemi kullanıldı.

Bu yöntemde parafine gömülü dokulardan, APES (3-aminopropyltriethoxysilane) kaplı lamlara 4 μ m kalınlığında kesitler alındı ve 37 $^{\circ}$ C' de 1 gece deparafinize edildi. Ardından kesitler üç ayrı ksilende beşer dakika ve iki ayrı alkolde onar dakika bekletilerek hidrate edildi. Endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için %3 H₂O₂ (metanolde)' de 20 dak bekletildi. Maskelenen antijenleri açığa çıkarmak için mikrodalga fırında 160 W güçte 15 dak süre ile Citrate Buffer (pH 6.0) uygulandı. Oda ısısında soğutulan lamalar PBS ile yıkandı. Non spesifik boyanmayı engellemek için lamlara Blocking Serum (Novostain Universal Detection Kit; NCL-RTU-D; Novocastra) damlatıldı ve 10 dak bekletildi. Ardından VEGF (C-1; sc-7269; Santa Cruz Biotechnology); BMP 7 (N-19; sc-6899; Santa Cruz Biotechnology); IL-6 (M-19; sc-1265; Santa Cruz Biotechnology), TGF β (NCL-TGFB;

Novocastra) ve PDEGF (NCL-PDEGF; Novocastra) ayrı ayrı damlatılarak oda ısısında 60 dakika inkübe edildi. İki ayrı PBS ile yıkanan kesitler Biotinlenmiş sekonder antikorda (Novostain Universal Detection Kit; NCL-RTU-D; Novocastra) 10 dakika inkübe edildi. PBS (Phosphate Buffer Saline) ile tekrar yıkanan kesitlere Streptavidine Peroxidase (Novostain Universal Detection Kit; NCL-RTU-D; Novocastra) uygulandı ve 10 dakika bekletildi. Son aşamada kromojen olarak DAB (Diaminobenzidine) kullanıldı ve Mayer Hematoksilene ile nükleer counterstain yapıldı. Dehidrate edilen kesitler ksilene alınarak nonaqueous kapama maddesi ile kapatıldı.

3.7.İstatiksel değerlendirme:

İstatiksel olarak 3 farklı yöntem kullanılmıştır.

1-Tek Yönlü ANOVA

Nicel verilerin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Dört bağımsız grup parametreler açısından ortalama değerlerine göre karşılaştırılmıştır. Sonuçlarda $p < 0.05$ olması anlamlı farklılık olarak değerlendirilmiştir. Bu durumda Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak oluşan farkın hangi gruplar arasında olduğu değerlendirilmiştir.

2-X2 testi:

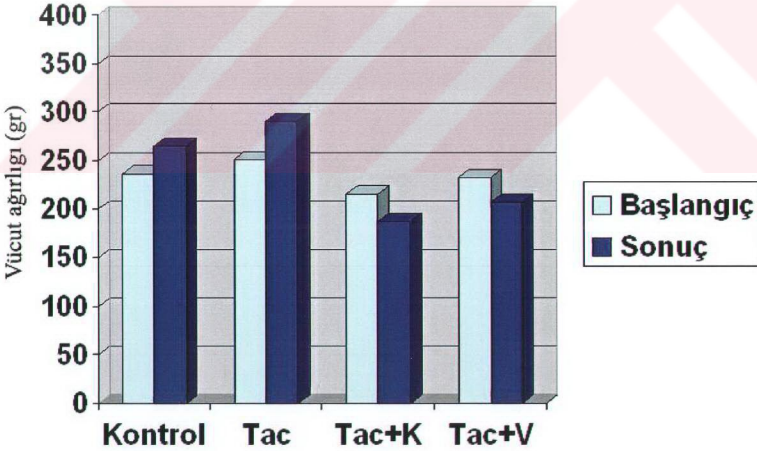
Nitel verilerin karşılaştırılması için kullanılmıştır. Sonuçlarda $p < 0.05$ olması anlamlı farklılık olarak değerlendirilmiştir.

3-T testi:

Çalışma öncesi ve sonrası nicel verilerin karşılaştırılmasında kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR:

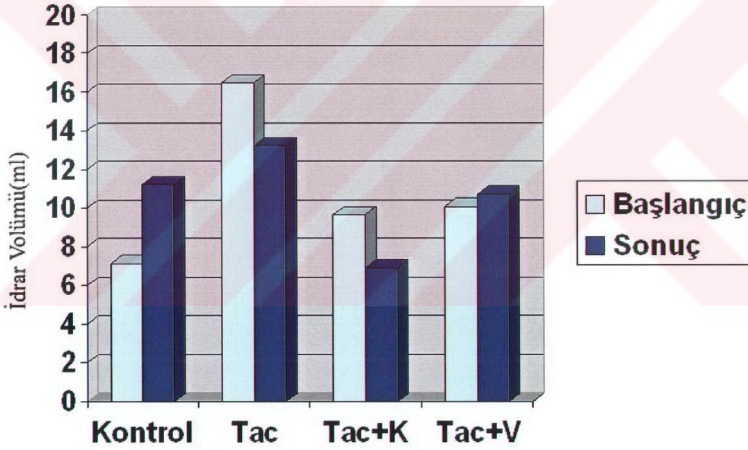
Çalışmamızda 28 günlük tedavi sonrasında tüm gruptaki hayvanların kan ve doku örnekleri değerlendirilmiştir. Çalışmada kan ve idrar örneklerinde renal fizyolojik değişiklikler, doku örneklerinde ise patolojik değişiklikler değerlendirilmiştir. Çalışma başında grupların ortalama vücut ağırlıkları arasında anlamlı fark saptanmamıştır (Tacrolimus grubunda 251.25 ± 42.47 gr, Tac+Kinapril grubunda 215.87 ± 27.30 gr, Tac+Valsartan grubunda 233.00 ± 26.03 gr, kontrol grubunda 236.42 ± 21.61 gr). Çalışma sonucunda, Tac tedavisi alan grubun ortalama vücut ağırlığı ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır. (Tacrolimus grubunda 290.12 ± 31.66 gr, kontrol grubunda 264.10 ± 37.34 gr) Çalışma sonunda Tac+Kinapril grubu (Grup 3) ve Tac+Valsartan grubunun (Grup 4) ortalama vücut ağırlığı kontrol grubuna ve sadece Tac grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.001$). Bu grupların çalışma sonundaki ortalama vücut ağırlıkları sırasıyla 187.01 ± 27.94 ve 206.28 ± 21.52 gr olarak saptanmıştır. Şekil-7'de grupların ortalama vücut ağırlıkları gösterilmektedir.



Şekil-7: Grupların çalışma başlangıcında ve çalışma sonundaki vücut ağırlıkları

Fizyolojik çalışmalar:

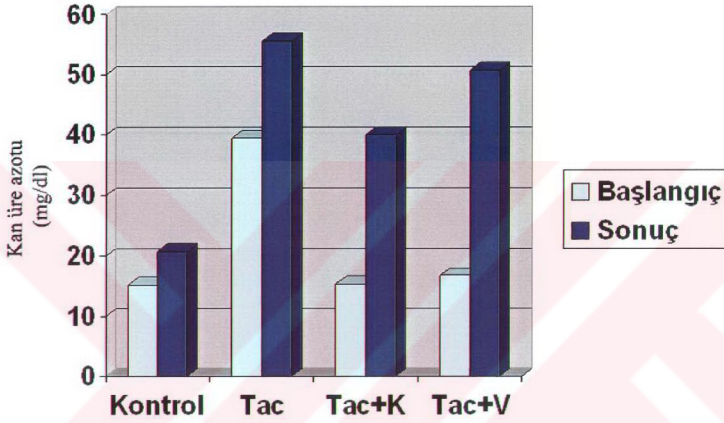
Çalışmanın başlangıcında Tacrolimus grubunun 24 saatlik idrar miktarı kontrol grubunun 24 saatlik idrar miktarından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tacrolimus grubunda 16.5 ± 7.19 ml/gün, kontrol grubunda 7.14 ± 5.16 ml/gün) ($p < 0.14$). Tac+Kinapril grubunda 9.65 ± 4.69 ml/gün, Tac+Valsartan grubunda 10.10 ± 4.09 ml/gün çalışma sonu 24 saatlik idrar miktarı açısından anlamlı fark saptanmadı. Çalışma sonunda 24 saatlik idrar miktarı, Tac alan grupta 13.25 ± 4.52 ml/gün, Tac+Kinapril alan grupta 6.91 ± 2.32 ml/gün, Tac+Valsartan alan grupta 10.70 ± 6.13 ml/gün, kontrol grubunda 11.21 ± 2.32 ml/gün olarak saptanmıştır. Bu değerlere göre Tac tedavisi alan grubun idrar miktarı Tac+Kinapril grubundan anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p < 0.23$). Diğer gruplar arasında bu açıdan anlamlı fark saptanmamıştır. Grupların ortalama idrar miktarları Şekil-8’de gösterilmektedir.



Şekil-8: Grupların çalışma başlangıcında ve çalışma sonundaki 24 saatlik idrar miktarları

Çalışma sonunda tüm gruplarda kan üre düzeyinde anlamlı yükselme olmuştur. Kontrol grubunda 15.14 ± 2.19 mg/dl’den 20.71 ± 2.69 mg/dl’ye ($p < 0.006$), Tac+Kinapril grubunda 15.25 ± 2.71 mg/dl’den 40.00 ± 28.95 mg/dl’ye ($P < 0.047$), Tac+Valsartan grubunda 16.71 ± 1.60

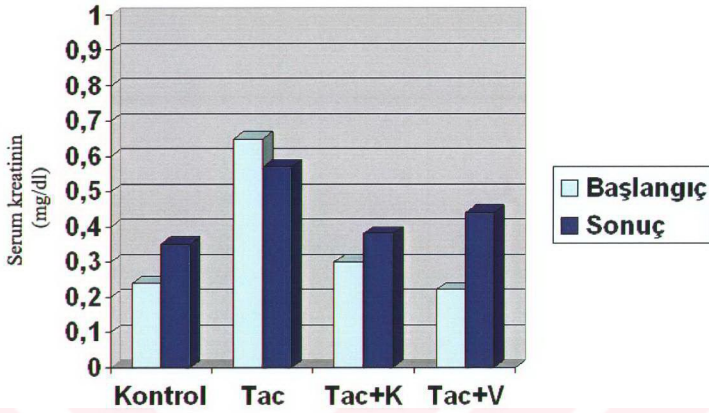
mg/dl'den 50.71 ± 33.79 mg/dl'ye ($P < 0.04$), Tacrolimus grubunda ise 39.48 ± 5.63 mg/dl'den 55.6 ± 9.13 mg/dl'ye ($P < 0.007$) yükselmiştir. Çalışma sonunda gruplar arasındaki üre yükselmesi açısından, sadece Tacrolimus grubu anlamlı yükselmiş görünüyor ise de; aslında kontrol grubu dışındaki tüm sıçanlarda kan üre düzeyi laboratuvar normallerinin üstünde çıkmıştır ($5-23$ mg/dl) (Şekil-9).



Şekil-9: Grupların çalışma başlangıcında ve çalışma sonundaki kan üre düzeyleri

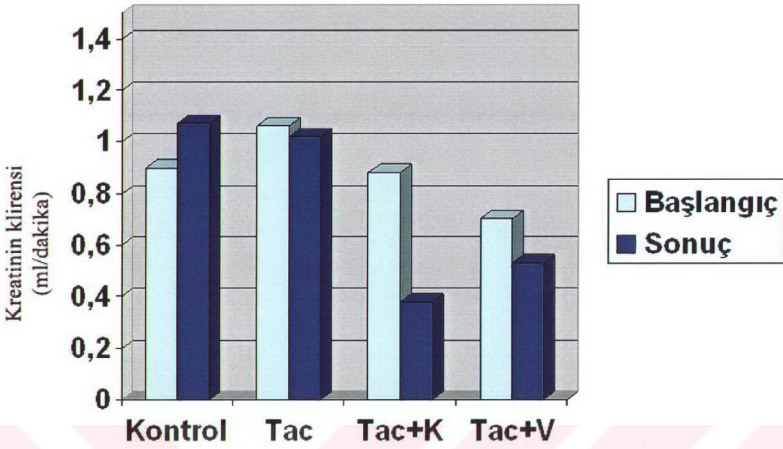
Çalışma başlangıcında Tacrolimus grubunun serum potasyumu 4.51 ± 0.30 mEq/L olup diğer gruplardan anlamlı olarak yüksektir ($P < 0.01$). Çalışma sonunda gruplar arasında ve grup içinde önce ve sonra kıyaslandığında serum potasyumunda fark saptanmamıştır. Yine çalışma sonunda sodyum değerlerinde de, hiçbir grupta anlamlı değişiklik olmamıştır.

Çalışma başında Grup 1, 2, 3 ve 4'de serum kreatinin değerleri sırasıyla 0.24 ± 0.2 , 0.3 ± 0.17 , 0.22 ± 0.2 , 0.65 ± 0.2 mg/dl saptanmıştır. Bu değerlere göre çalışma başlangıcında Grup 1, 2 ve 3'de kreatinin düzeyleri Grup 4'e göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p < 0.0001$). Çalışma sonunda Grup 1'de ($p = 0.005$), Grup 2'de ($p < 0.0001$), Grup 3'de ($p < 0.05$) serum kreatinininde anlamlı artış olmuştur, Grup 4'de ise çalışma başında ve sonunda serum kreatinininde anlamlı değişiklik olmamıştır. Çalışma sonundaki serum kreatinin değerleri Grup 1, 2, 3, 4'de sırasıyla 0.35 ± 0.2 , 0.38 ± 0.2 , 0.44 ± 0.11 , 0.57 ± 0.11 mg/dl olarak saptanmıştır (Şekil-10).



Şekil-10: Grupların çalışma başlangıcında ve çalışma sonundaki kreatinin düzeyleri

Çalışmamızda, glomerüler filtrasyon hızının bir göstergesi olarak kreatinin klirensi değerlendirilmiştir. Şekil 14’de görüldüğü gibi her bir grup içinde çalışma sonunda kontrol grubu, Tac grubu, Tac+ Kinapril grubunda kreatinin klirensinde anlamlı bir düşüş olmamıştır. Sadece Tac+Valsartan grubunda çalışma sonunda kreatinin klirensi anlamlı olarak düşmüştür. ($p < 0.41$) Yine çalışma başlangıcında kreatinin klirensi açısından gruplar arasında anlamlı fark yokken çalışma sonunda ACE inhibitörü grubun kreatinin klirensi kontrol ($p < 0.01$) ve Tac alan gruba ($p < 0.01$) göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Gruplar içinde çalışmanın öncesi ve sonrası arasındaki kreatinin klirensinde değişiklik araştırıldığında Grup 1, Grup 3, Grup 4’de anlamlı bir değişiklik olmamıştır, Grup 2’deki değişiklik ise anlamlılık sınırındadır ($p=0.05$) (Şekil-11).



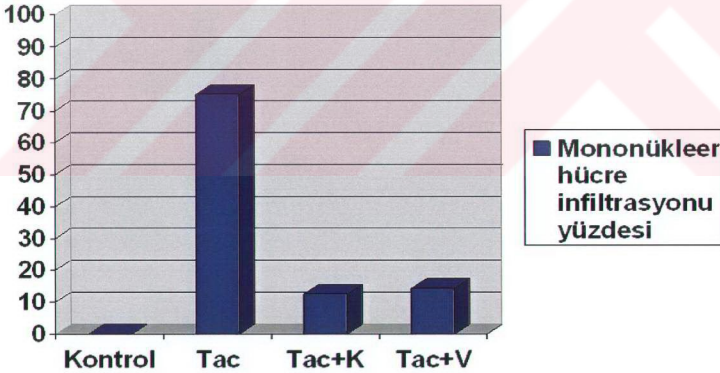
Şekil-11: Çalışma sonunda grupların ortalama kreatinin klirensi değerleri

ACE inhibitörü ve Ang II reseptör blokleri tedavisi ile oluşan böbrek koruyucu etkinin, bu iki ilacın Tacrolimus düzeylerine olan etkisinden bağımsız olduğunu göstermek için yapılan Tacrolimus düzeyi ölçümlerinde, Tac grubunda 13.36 ± 9.52 ng/ dl, Tac+Kinapril grubunda 4.63 ± 1.62 ng/ dl, Tac+Valsartan grubunda 5.65 ± 2.56 ng/ dl, olarak ölçülmüş ve gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Histopatolojik çalışmalar:

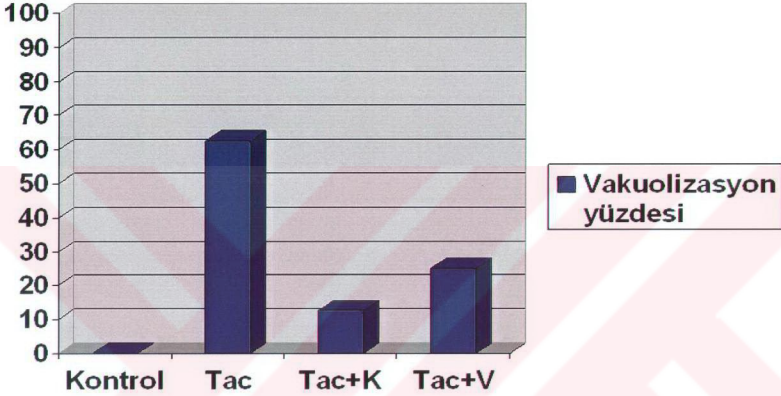
Hemotoksilen-Eosin boyası ile boyanan kesitler, 100 büyütme alanında toplam 10 mikroskop alanı incelenerek, intersitisyel mononükleer hücre infiltrasyonu, intersitisyel ödem, tubuler düzensizlik, fokal vakuolizasyon, kalsifikasyon gelişimi açısından değerlendirildi. Bu bulguların gelişimi Tacrolimus nefrotoksitesisi göstergesi olarak kabul edildi. Tacrolimus alan tüm gruplarda değişik derecelerde olmak üzere intersitisyel mononükleer hücre artışı, fokal vakuolizasyon ve kalsifikasyon başta olmak üzere diğer nefrotoksite bulguları belirgin olarak görüldü. Kontrol grubunda ise hafif konjesyon, damar duvarlarında hafif kalınlaşma ve bir sıçanda kalsifikasyon dışında bulgu tespit edilmemiştir (Resim-1).

Kontrol grubundaki sıçanların kesitlerin hiçbirinde intersitisyumda mononükleer hücre infiltrasyonu saptanmazken, Tac grubunda %75 oranında mononükleer hücre infiltrasyonu saptanmıştır. Tac+Kinapril grubunda %12.5, Tac+Valsartan grubunda %14.3 oranında mononükleer hücre infiltrasyonu saptanmıştır ($p<0.005$) (Şekil-12).



Şekil-12: Tüm gruplarda intersitisyumda mononükleer hücre infiltrasyonu yüzdesi

Bizim çalışmamızda kontrol grubunda vakuolizasyona hiç rastlanmazken Tacrolimus grubunda %62.5 oranında vakuolizasyon görülmüştür ($p=0.007$). Tac+Kinapril grubunda vakuolizasyon oranı %12.5, Tac+Valsartan grubunda 28.6'dır ($p<0.05$) (Resim-2). Tac+Kinapril grubunda kalsifikasyon oranı %62.5 iken, Tac+Valsartan grubunda %28.6, Tac grubunda ise %25'dir. (Resim-3)



Şekil-13: Tüm gruplarda vakuolizasyon yüzdesi

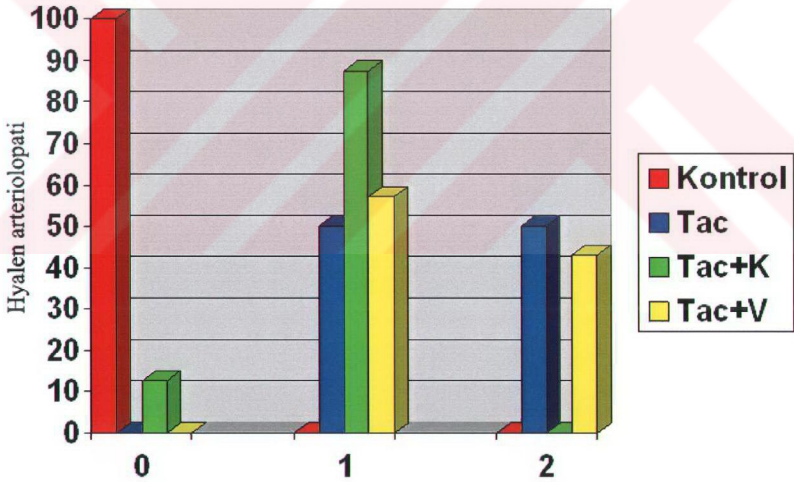
Tacrolimus nefrotoksitesi tanımında en önemli iki lezyon sırasıyla tubulointerstitiyel fibrozis ve arteriyol hasarı gelişimidir. Çalışmamızda ACE inhibitörü ve Ang II reseptör blokleri ilaç tedavisinin, Tacrolimusa bağlı gelişen böbrek hasarı üzerine olan etkisinin değerlendirilmesiyle amacıyla, doku örneklerinde afferent arteriolopati ve tubulointerstitiyel fibrozis değerlendirilmiştir.

ArterioloPATI değerlendirilmesi: PAS ile boyanan kesitler, 100 büyütme alanında ve her kesitte en az 50 glomerül incelenerek afferent arteriyol destrüksiyonu ve hyalen arteriolopati açısından değerlendirilmiştir. Çalışmamızda Tac grubundaki sıçanların glomerül arterleri incelendiğinde % 50.0 oranında hafif hyalinozis, %50 belirgin hyalinozis bulundu. Tac+kinapril grubunda %87.5 oranında hafif hyalinozis saptandı, bu grupta belirgin hyalinozis gösteren sıçan yoktu. Tac+Valsartan grubunda ise % 57.1 oranında hafif hyalinozis, %42.9 oranında belirgin hyalinozis bulunmuştur. Kontrol sıçanlarında ise hiç hyalinozis saptanmamıştır ($p<0.0001$) (Resim:1, 3-5).

Gruplar	Hyalen arteriolopati derecesi		
	0	1	2
Kontrol (n) (%)	7 (%100)		0
Tac (n) (%)		4 (%50)	4 (%50)
Tac+K (n) (%)	1 (%12.5)	7 (%87.5)	
Tac+V (n) (%)		4 (%57.1)	3 (%42.9)

Tablo- 8: PAS ile boyanan kesitlerin afferent arteriol destrüksiyonu ve hyalen arteriolopati açısından incelenmesi

0: hyalinozis yok 1: hafif hyalinozis 2:belirgin hyalinozis



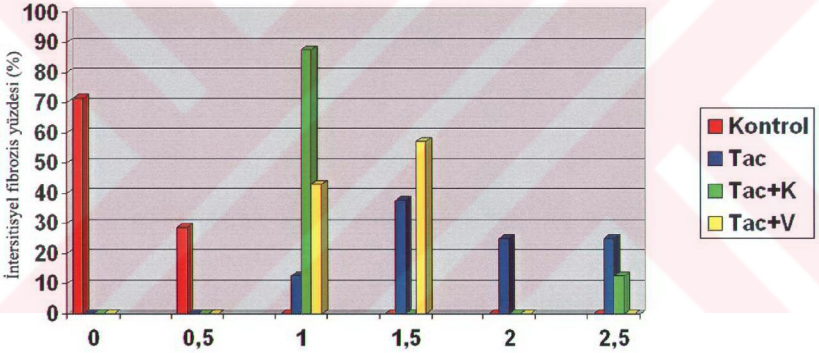
Şekil-13 : PAS ile boyanan kesitlerin afferent arteriol destrüksiyonu ve hyalen arteriolopati açısından incelenmesi

0: hyalinozis yok 1: hafif hyalinozis 2:belirgin hyalinozis

Tubulointersitysel fibrozis değerlendirmesi: Trikrom-Mason boyası ile boyanan kesitler, 100 büyütmede 10 mikroskop alanı incelenerek, intersitysel fibrozis aısından değerlendirilmiştir. İntersitysel fibrozis derecesi semikantitatif olarak belirtilmiştir. Tablo-9'da gösterildiği gibi, Tacrolimus grubunun renal patolojik incelemelerinde, %12.5 oranında % 5-15 fibrozis, %37.5 oranında % 16-25 fibrozis, %25 oranında % 26-35 fibrozis, %25 oranında 36-45 fibrozis saptanmıştır; yani bu grupta % 50 sanda % 25'in üzerinde fibrozis mevcuttur. Kontrol grubundaki sanların 5 tanesinde (%71.4) hi fibrozise rastlanmamış, 2 tanesinde ise (%28.6) %5 'in altında fibrozis saptanmıştır. Tac+Kinapril grubunda % 87.5 oranında %5-15 fibrozis, %12.5 oranında %36-45 fibrozis; Tac+Valsartan grubunda ise %42.9 oranında %5-15 fibrozis, %57.1 oranında 16-25 fibrozis saptandı. Kontrol grubundaki sanların böbrek dokularında ise <%5 fibrozis bulunmuştur (p<0.005) (Resim: 6-8)

Grup	Fibrozis					
	0	0.5	1	1.5	2	2.5
Kontrol	5 (%71.4)	2 (%28.6)				
Tac			1 (%12.5)	3 (%37.5)	2 (%25)	2 (%25)
Tac+K			7 (%87.5)			1 (%12.5)
Tac+V			3 (%42.9)	4 (%57.1)		

Tablo-9: Trikrom-Mason boyası ile intersitiyel fibrozis gösterilmesi



Şekil-14: Tüm gruplarda intersitiyel fibrozis yüzdeleri

Normal intersitisyum=0

%5'in altında fibrotik alan: 0.5

%5-15 arasında fibrotik alan: 1

%16-25 arasında fibrotik alan: 1.5

%26-35 arasında fibrotik alan: 2

%36-45 arasında fibrotik alan: 2.5

%45'in üzerinde fibrotik alan: 3

İmmünohistokimya değerlendirmeleri:

Kesitler uygun boyama yöntemiyle boyandıktan sonra değerlendirilmeye alınmıştır. En az 10 glomerül içeren tubulointerstitiyel alanda, TGF- β 1, PDGF, BMP-7; IL-6 ve VEGF immünoekspresyonu glomerül ve tubüllerde semikantitatif olarak değerlendirilmiştir.

a) TGF- β 1 immünoekspresyonu:

Tablo-10 ve Şekil-15'te gösterildiği gibi Tacrolimus alan tüm gruplarda (Grup 2, Grup 3, Grup 4) TGF- β immünoekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.0001$) (Resim: 9-11).

b) PDGF immünoekspresyonu:

Tablo-11'de ve Şekil-16'da gösterildiği gibi Tacrolimus alan tüm gruplarda (Grup 2, Grup 3, Grup 4) PDGF immünoekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.005$) (Resim: 12-14)

c) BMP-7 immünoekspresyonu:

Tablo-12'de ve Şekil-17'da gösterildiği gibi Tacrolimus alan tüm gruplarda (Grup 2, Grup 3, Grup 4) BMP-7 immünoekspresyon derecesi açısından kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanamamıştır ($p > 0.05$) (Resim: 15-17)

d) IL-6 immünoekspresyonu:

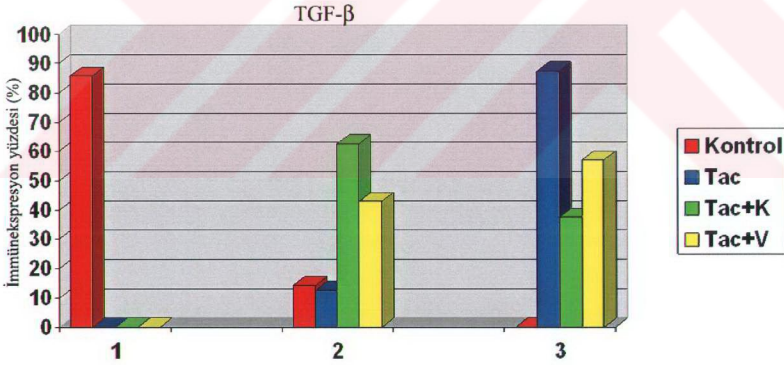
Tablo-13 ve Şekil-18'da gösterildiği gibi Tacrolimus alan tüm gruplarda (Grup 2, Grup 3, Grup 4) IL-6 immünoekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.0001$) (Resim: 18-19).

e) VEGF immünoekspresyonu:

Tablo-14 ve Şekil-19'da gösterildiği gibi Tacrolimus alan tüm gruplarda (Grup 2, Grup 3, Grup 4) VEGF immünoekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.0001$) (Resim: 20-22).

Gruplar	TGF- β glomerüler ekspresyon derecesi		
	1	2	3
Kontrol (n) (%)	6 (%85.7)	1 (%14.3)	0
Tac (n) (%)		1 (%12.5)	7 (%87.5)
Tac+K (n) (%)		5 (%62.5)	3 (%37.5)
Tac+V (n) (%)		3 (%42.9)	4 (%57.1)

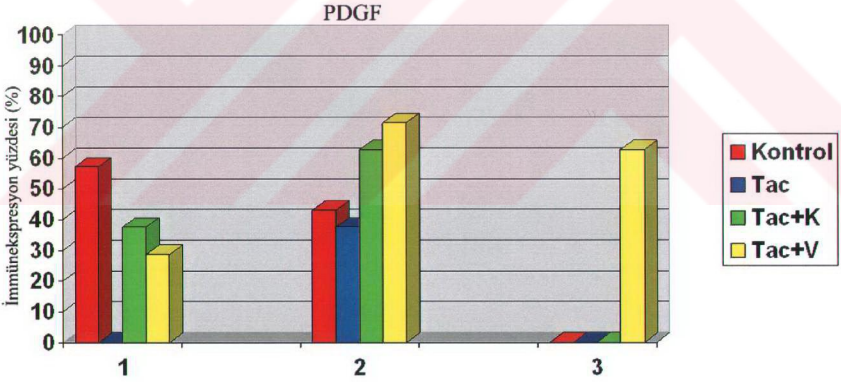
Tablo-10: TGF- β glomerüler ekspresyon derecesinin gruplar arasındaki farkı
1: hafif ekspresyon 2: orta ekspresyon 2: şiddetli ekspresyonu göstermektedir.



Şekil-15: Tüm gruplarda TGF- β ekspresyon yüzdeleri

Gruplar	PDGF glomerüler ekspresyon derecesi		
	1	2	3
Kontrol (n) (%)	4 (%57.1)	3 (%42.9)	0
Tac (n) (%)		3 (%37.5)	5 (%62.5)
Tac+K (n) (%)	3 (%37.5)	5 (%62.5)	
Tac+V (n) (%)	2 (%28.6)	5 (%71.4)	

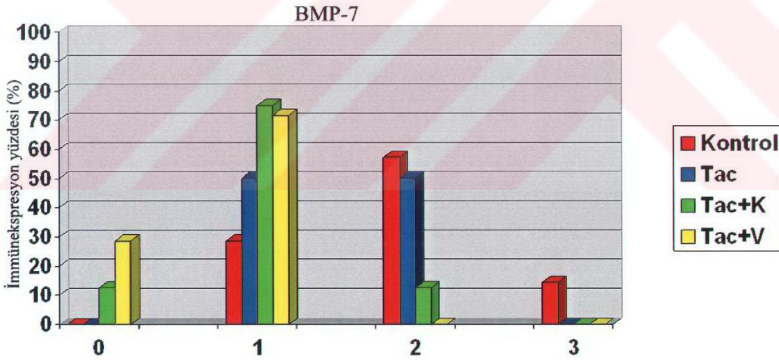
Tablo-11: PDGF glomerüler ekspresyon derecesinin gruplar arasındaki farkı
1: hafif ekspresyon 2: orta ekspresyon 3: şiddetli ekspresyonu göstermektedir.



Şekil-16: Tüm gruplarda PDGF ekspresyon yüzdeleri

Gruplar	BMP-7 glomerüler ekspresyon derecesi			
	0	1	2	3
Kontrol (n) (%)		2(%28.6)	4(%57.1)	1(%14.3)
Tac (n) (%)		4 (%50.0)	4 (%50)	
Tac+K (n) (%)	1 (%12.5)	6 (%75)	1 (%12.5)	
Tac+V (n) (%)	2 (%28.6)	5(%71.4)		

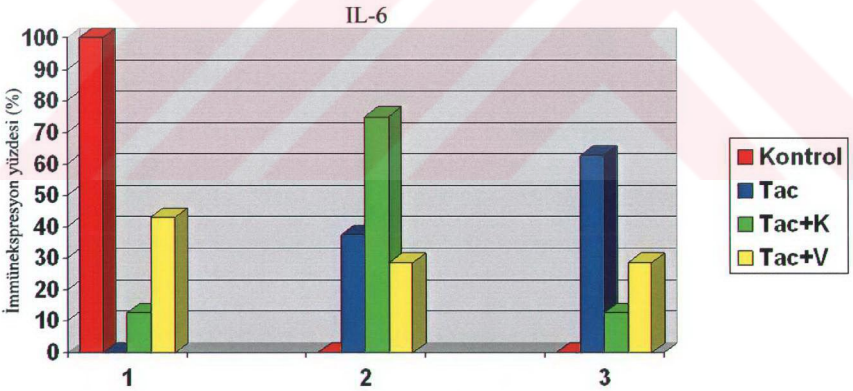
Toblo-12: BMP-7 glomerüler ekspresyon derecesinin gruplar arasındaki farkı
1: hafif ekspresyon 2: orta ekspresyon 2: şiddetli ekspresyonu göstermektedir



Şekil-17: Tüm gruplarda BMP-7 ekspresyon yüzdeleri

Gruplar	IL-6 glomerüler ekspresyon derecesi		
	1	2	3
Kontrol (n) (%)	7 (%100)	3 (%42.9)	0
Tac (n) (%)		3 (%37.5)	5 (%62.5)
Tac+K (n) (%)	1 (%12.5)	6 (%75)	1 (%12.5)
Tac+V (n) (%)	3 (%42.9)	2 (%28.6)	2 (%28.6)

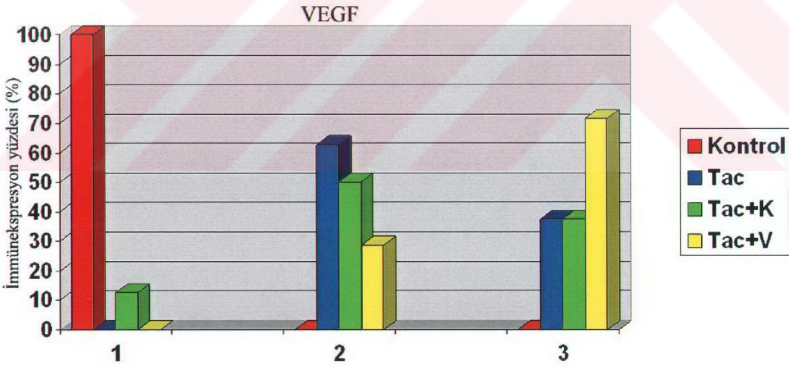
Tablo-13: IL-6 glomerüler ekspresyon derecesinin gruplar arasındaki farkı
1: hafif ekspresyon 2: orta ekspresyon 3: şiddetli ekspresyonu göstermektedir.



Şekil-18: : Tüm gruplarda IL-6 ekspresyon yüzdeleri

Gruplar	VEGF glomerüler ekspresyon derecesi		
	1	2	3
Kontrol (n) (%)	7 (%100)	0	0
Tac (n) (%)		5 (%62.5)	3 (%37.5)
Tac+K (n) (%)	1 (%12.5)	4 (%50.0)	3 (%37.5)
Tac+V (n) (%)		2 (%28.6)	5 (%71.4)

Toblo-14: VEGF glomerüler ekspresyon derecesinin gruplar arasındaki farkı
1: hafif ekspresyon 2: orta ekspresyon 3: şiddetli ekspresyonu göstermektedir.



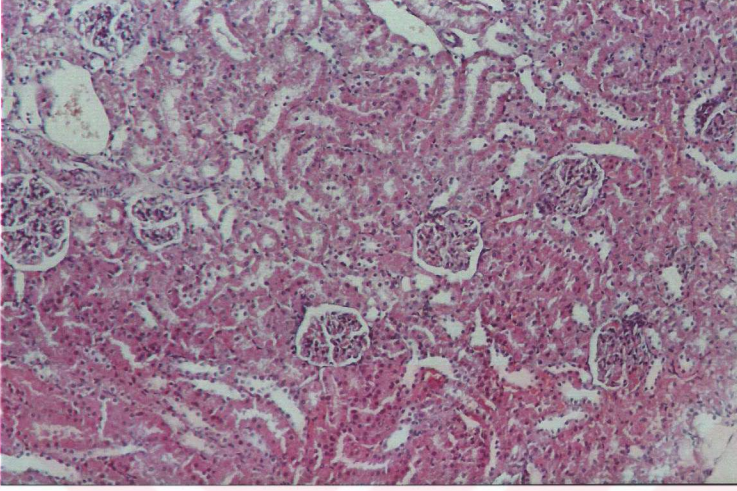
Şekil-19: Tüm gruplarda VEGF ekspresyon yüzdeleri

Fibrozis ile TGF- β , PDGF, BMP-7, IL-6, VEGF immünekspresyonları karşılaştırıldığında;

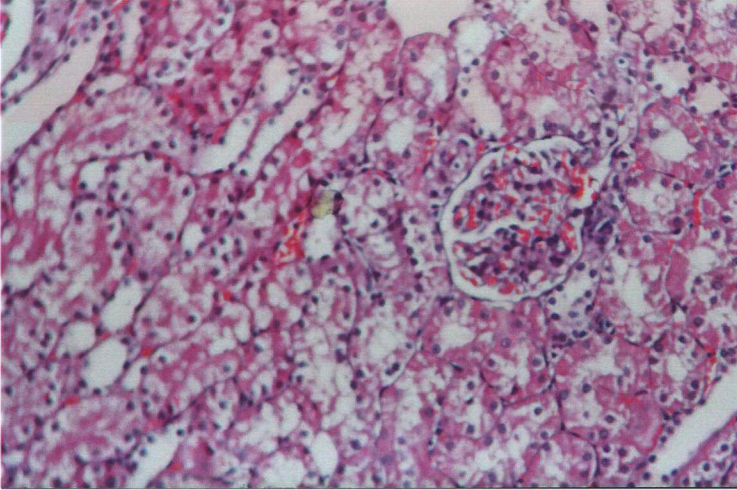
Fibrozis şiddeti ile TGF- β ($p<0.001$), IL-6 ($p<0.05$) ve VEGF ($p<0.001$) immünekspresyon şiddeti arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon belirlenmiştir

Hyalen arteriolopati şiddeti ile TGF- β ($p<0.0001$), IL-6 ($p<0.05$) ve VEGF($p<0.0001$) immünekspresyon şiddeti arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon belirlenmiştir.

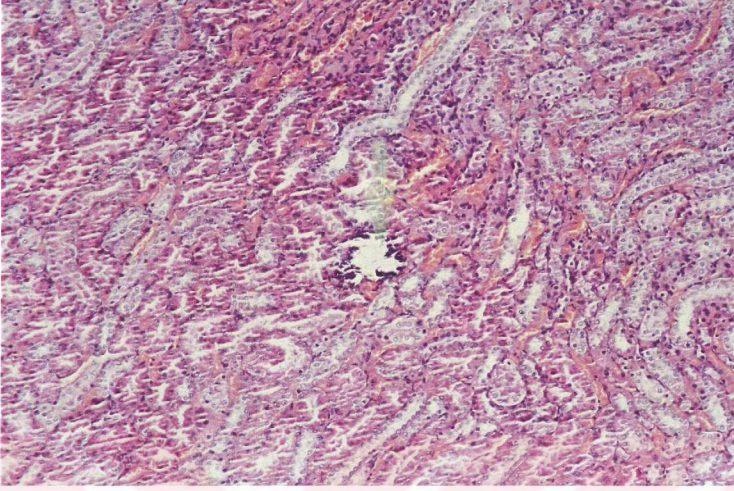
5.RESİMLER



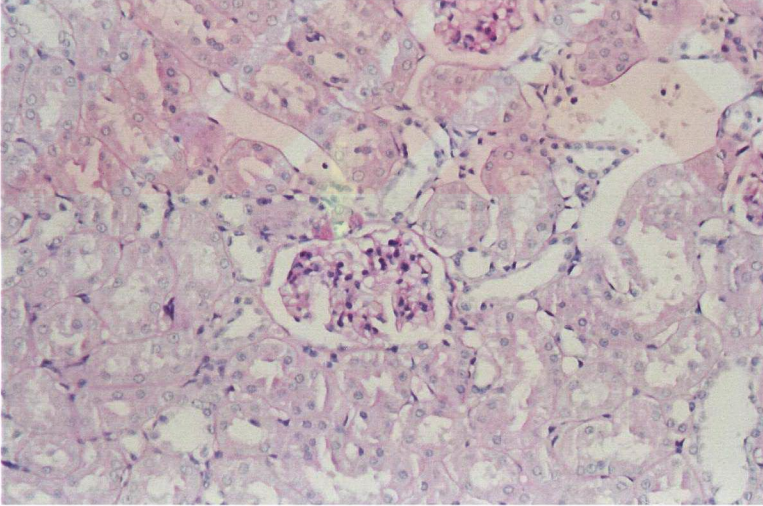
Resim-1: Kontrol grubu (HD-1B). Normal glomerül ve tubulointersitisel yapı, (Hemotoksilen-Eosin (H-E) boyası; 100x)



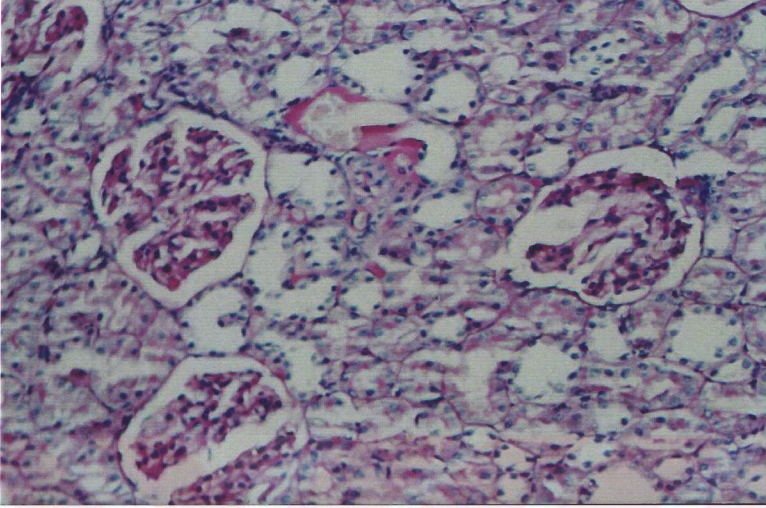
Resim-2: Tacrolimus+Valsartan grubunda (HDV-4B) proksimal tüp epitellerinde vakuolizasyon(H.E; 200x)



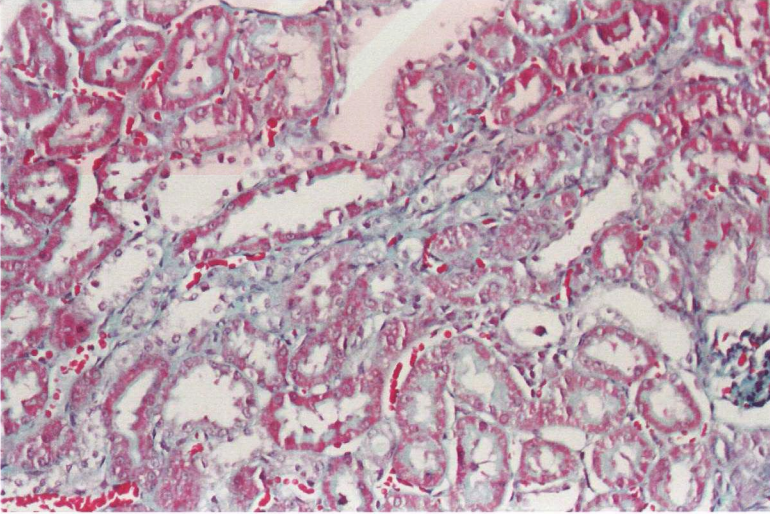
Resim-3:Tacrolimus grubu (TAC-G1-1) arteriolar hiyalinozis, fokal fibrozis, kalsifikasyon (ok ile işaretli) (Hemotoksilen-Eosin (H-E) boyası; 100x)



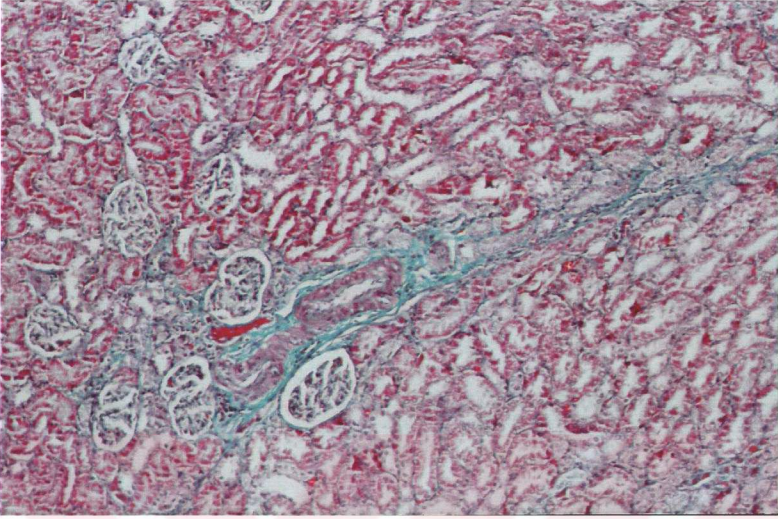
Resim-4: Tacrolimus grubunda (TAC-G1-1) arter duvarında hiyalinizasyon gelişimi (ok ile işaretli) (PAS; 200x)



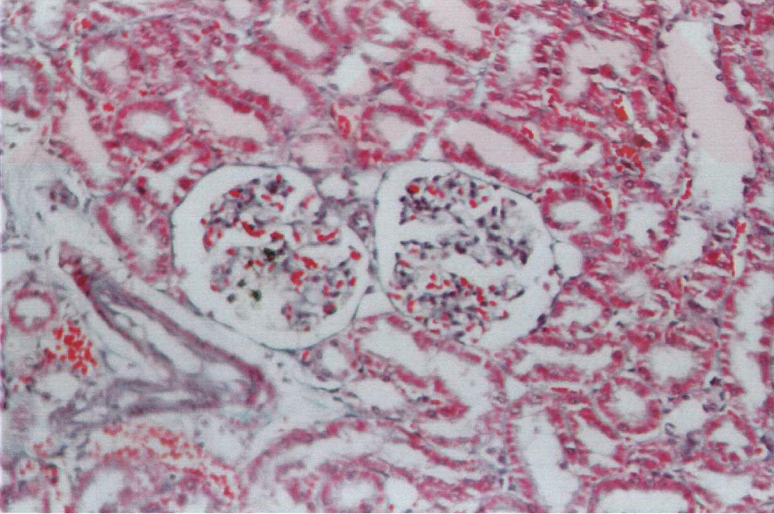
Resim-5: Tacrolimus+Kinapril grubunda (HDA-4B) damar duvarlarında hiyalinizasyon(PAS; 200x)



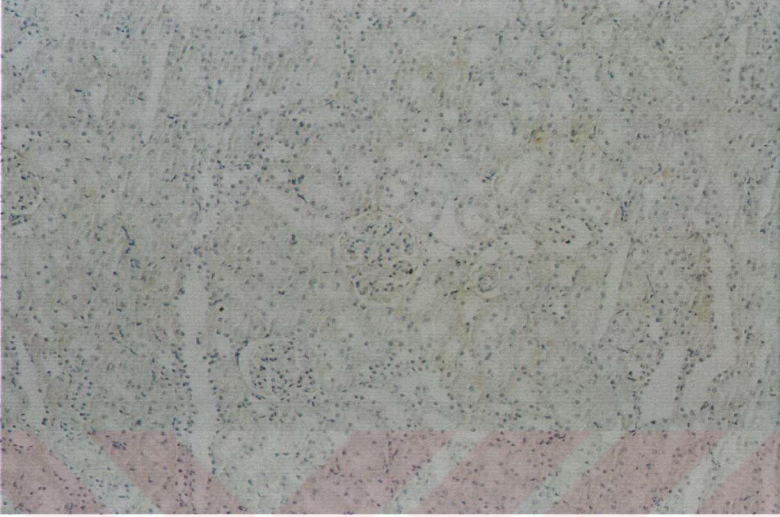
Resim-6: Tacrolimus grubunda (TAC-G2-4) tubulointersitisel alanda şiddetli fibrozis gelişimi (M. Trikrom; 100x)



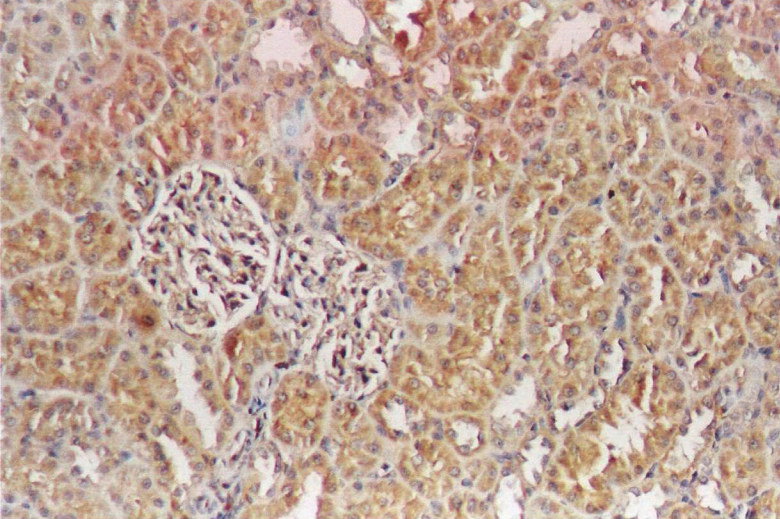
Resim-7: Tacrolimus+Kinapril grubunda (HD3-1B) tubulointersitisyumda artmış fibrozis (Grade 1) (Mason Trikrom 100x)



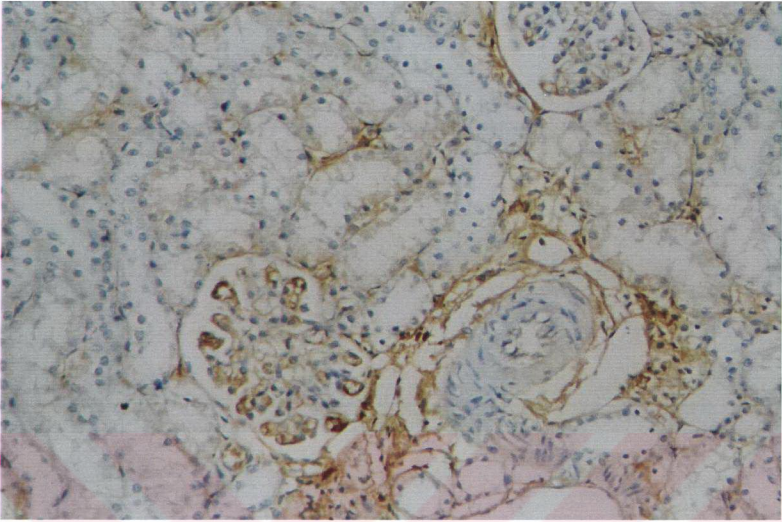
Resim-8: Tacrolimus+Valsartan grubunda (HDV-4B) tubulointersitisyumda hafif fibrozis (M. Trikrom; 200x)



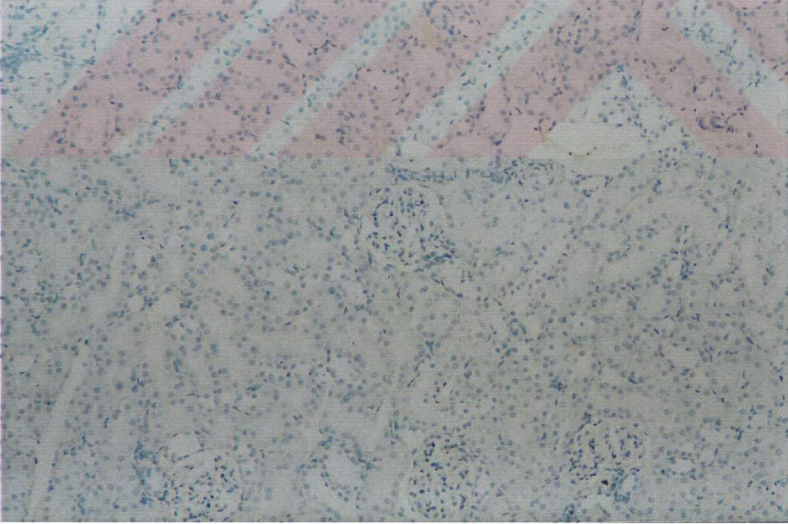
Resim-9: Kontrol grubunda (HD1-4) tubulointersitisyumda hafif TGF-β(+) immünekspresyonu (İHK; 100x)



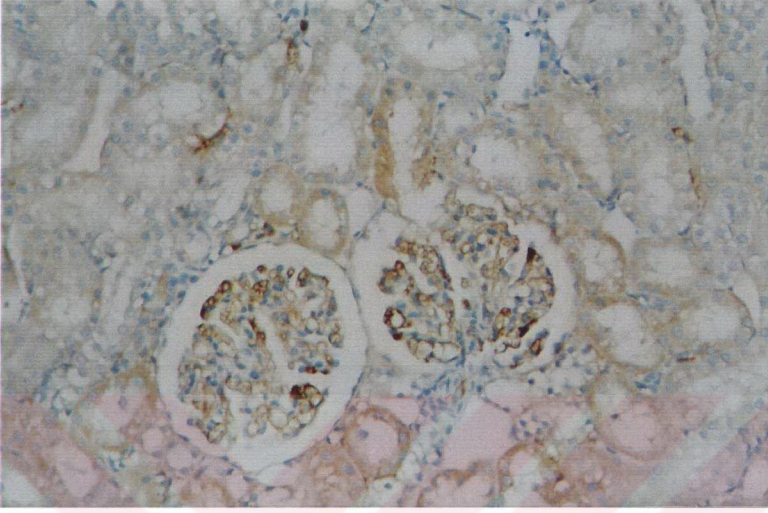
Resim-10: Tacrolimus grubunda (TAC-G1-5) glomerül ve tubulointersitisyel alanda şiddetli TGF-β(+++) immünekspresyonu (İHK, 200x)



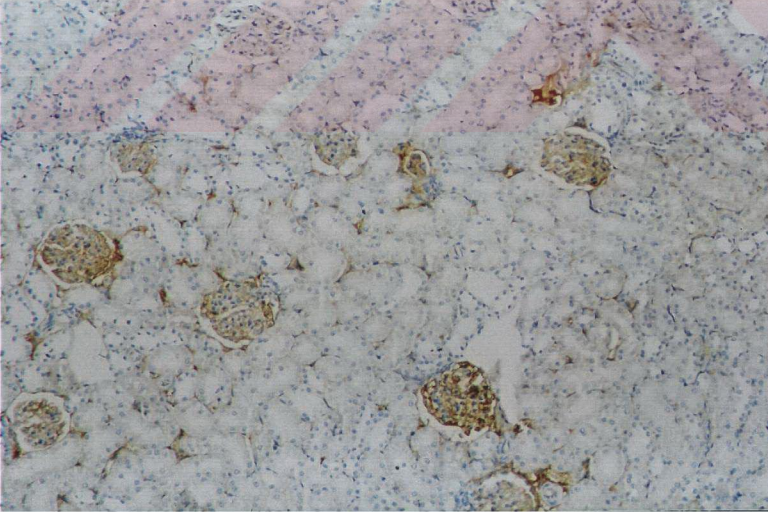
Resim-11: Tacrolimus+Kinapril grubunda (HD3-1B) tubulointersitisyunda artmış TGF- β (++) immünekspresyonu (İHK; 100x)



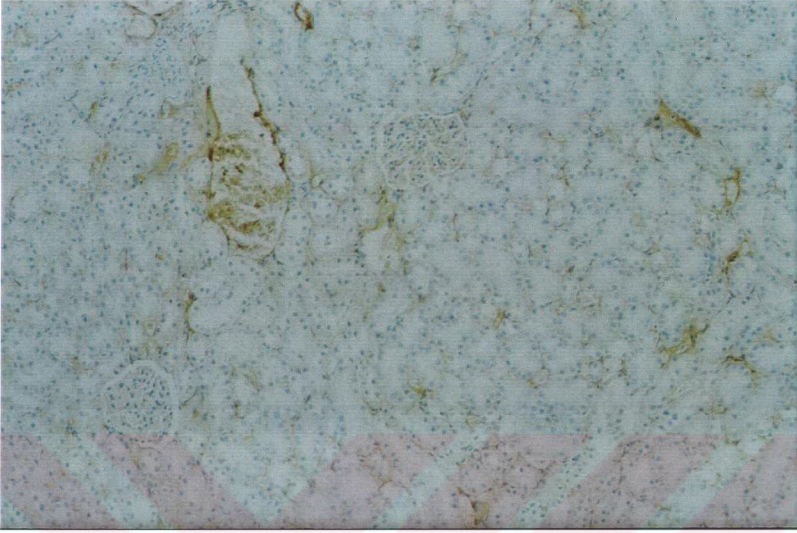
Resim-12: Kontrol grubunda (HD1-2B) böbrek dokusunda PDGF immünekspresyonu negatifliği (İHK; 100x)



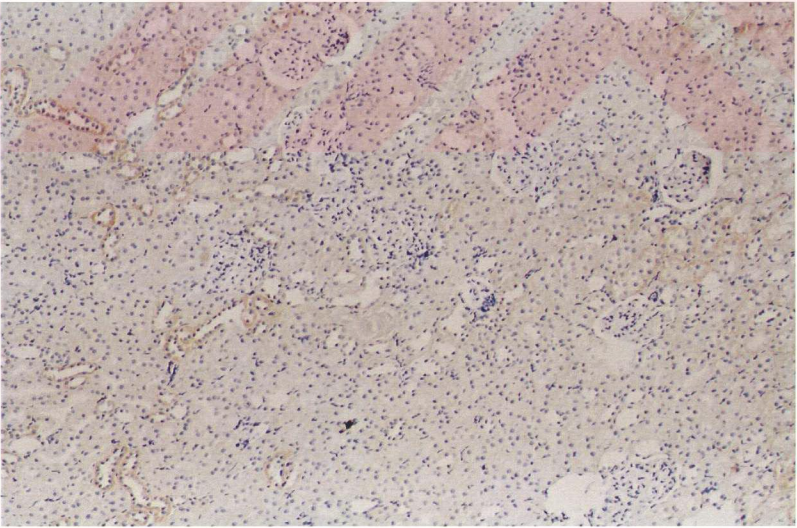
Resim-13: Tacrolimus grubunda (Tac1-4B) tubulointerstitisyumda artmış PDGF (+++) immünekspresyonu (İHK; 200x)



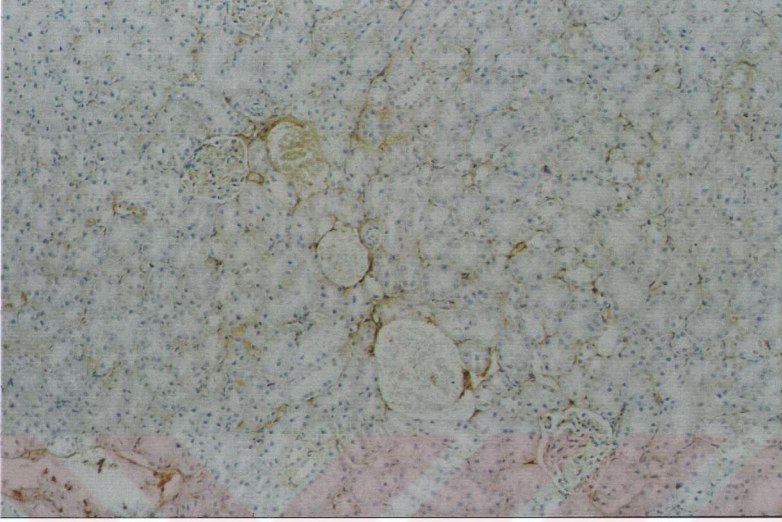
Resim-14: Tacrolimus+Kinapril grubunda (HD4-2B) tubulointerstitisyumda artmış PDGF (++) immünekspresyonu (İHK; 100x)



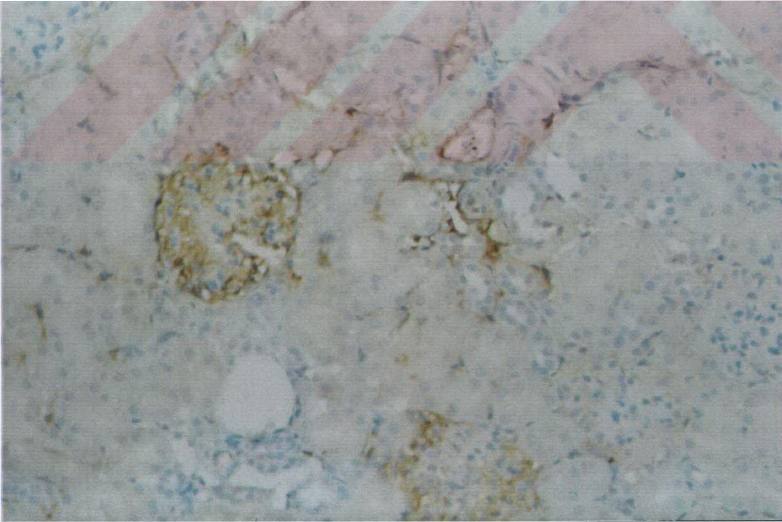
Resim-15: Kontrol grubunda (HD1-2B) intersitsiyumda artmış BMP-7 (+++) immünekspresyonu, (İHK; 100x)



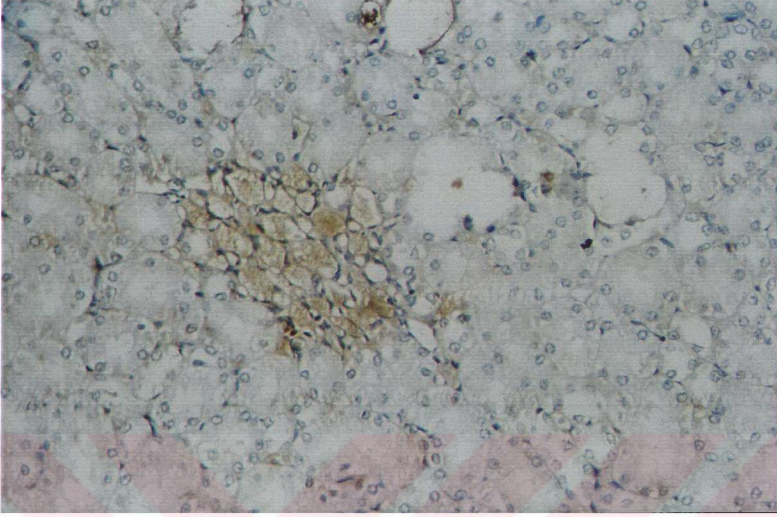
Resim-16: Tacrolimus grubunda (TAC-G1-3) glomerüler ve tubulointersitsiyel alanda hafif BMP-7(+) immünekspresyonu (İHK; 100x)



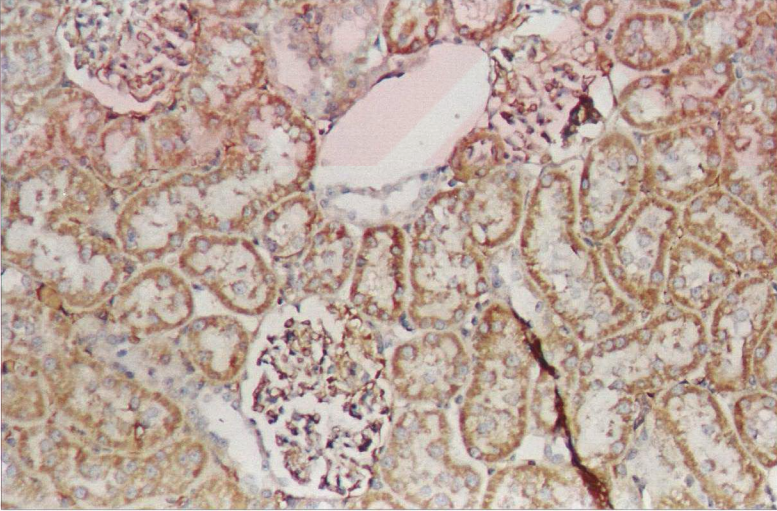
Resim-17: Tacrolimus+Valsartan grubunda (HDV-2B) intersitisyumda hafif BMP-7(+) immünekspresyonu, (İHK; 100x)



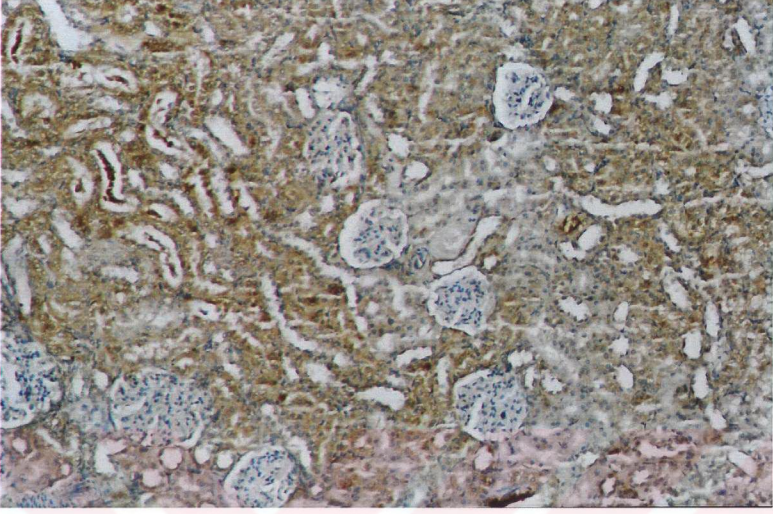
Resim-18: Tacrolimus grubunda (TAC-G1-2B) tubulointersitisyumda artmış IL-6(+++) immünekspresyonu, (İHK; 100x)



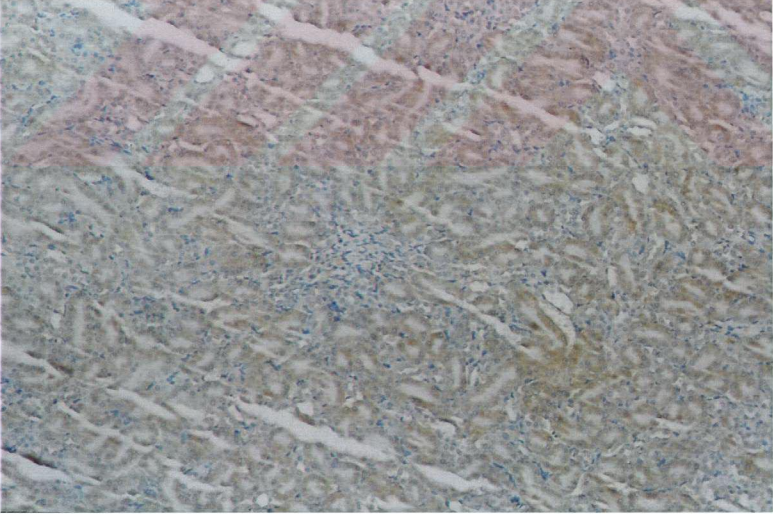
Resim-19: Tacrolimus+Valsartan grubunda (HDV-2B) tubulointerstitiyumda orta derecede IL-6 (++) immünekspresyonu (İHK; 200x)



Resim-20: Tacrolimus grubunda (TAC-G2-3) glomerül ve tubulointerstitiyel alanda şiddetli VEGF(+++) immünekspresyonu (İHK; 200x)



Resim-21: Tacrolimus+Kinapril grubunda (HD4-1B) tubulointersitisyumda artmış VEGF(+++) immünekspresyonu (İHK; 100x)



Resim-22: Tacrolimus+Valsartan grubunda (HDV-1B) orta derecede VEGF (++) immünekspresyonu (İHK; 100x)

6-TARTIŞMA:

Çalışmamızda kronik Tacrolimus nefrotoksisitesinde böbrekte gelişen işlevsel ve yapısal hasarın patogeneğinde TGF- β , PDGF, VEGF, IL-6 ekspresyonu ve antifibrotik özellikli bir sitokin olan BMP-7 ekspresyonu ile ACE inhibitörü ve Ang II reseptör blokleri tedavisinin bu sitokinler ve renal hasar üzerine etkisi araştırılmıştır.

Deneyisel hayvan modellerinde Tacrolimus'un sebep olduğu GFR'de azalma ve tubulointerstitiyel fibrozis diyet sodyumuna bağımlıdır; bu sebeple çalışmamız süresince tüm sıçanlar düşük tuzlu diyetle beslenmiştir. Yine deneyisel modellerde nefrotoksisite insan için terapötik olan Tacrolimus tam kan düzeyinde meydana gelir (5). Transplant hastalarında kullanılan Tacrolimus dozu (0.3 mg/ kg) bizim sodyum deplete sıçanlarda kullandığımız deneyisel dozlardan çok daha küçüktür fakat sıçanlardaki Tacrolimus kan düzeyi insanlarda gözleneneye çok benzerdir (28). Katari ve arkadaşlarının yaptığı bir klinik çalışmada 22 hastanın 18'inde (%82) Tacrolimusun plasma ve kan düzeyleri terapötik aralıktadır (49). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak nefrotoksisite gelişen sıçanlarda Tacrolimus düzeyi birbirinden farksızdır ve terapötik sınırdadır. Nefrotoksisitenin ilacın böbrek dokusunda ulaştığı konsantrasyon ile ilişkili olduğu gerçeği sıçan böbreğinde daha az biriken siklosporin G'nin, siklosporin A'dan daha az nefrotoksik olduğunun gösterilmesiyle (158) ispatlanmıştır. Dokuda Tacrolimus konsantrasyonu ile yeterli bilginiz yoktur fakat Tacrolimus'un lipofilik özelliği nedeniyle dokudaki konsantrasyonunun kan ve plasmadan daha yüksek olması beklenmekte; bu da ilaç düzeyi normal sınırdan olmasına rağmen nefrotoksisite gelişimini izah etmektedir. Yine Tacrolimus düzeylerinin tüm gruplarda birbirinden farksız olması, ACE inhibitörü ve Ang II reseptör blokleri tedavisi ile oluşan böbrek koruyucu etkinin, bu iki ilacın Tacrolimus düzeylerine olan etkisinden bağımsız olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda sıçanlarda kronik nefrotoksisite oluşturmak için 28 gün süreyle 1mg/kg/ gün intraperitoneal Tacrolimus tedavisi uygulanmıştır. Çalışma sonunda Tac+Kinapril ve Tac+Valsartan grubundaki hayvanlarda kontrol grubu ve Tac grubuyla kıyaslandığında anlamlı kilo kaybı tespit edilmiştir; söz konusu iki ilaç orogastrik yoldan tüple verildiğinden, akciğer enfeksiyonu ve travmaya sekonder gelişen komplikasyonlar bu hayvanlarda gelişen kilo kaybını açıklayabilir. Kontrol grubunda ve Tacrolimus'u tek başına alan grupta kilo kaybı olmamıştır çünkü bu iki gruba da orogastrik yolla ilaç verilmemiştir.

Kan üre düzeyi hem Tacrolimus alan grupta, hem de Tac+kinapril hem de Tac+valsartan alan grupta yükselmiştir. İstatiksel anlamlı üre artışı çalışma sonunda sadece Tacrolimus grubunda olmuş görünüyor ise de; aslında kontrol grubu dışındaki tüm sıçanlarda kan üre düzeyi laboratuvar normallerinin (5-23 mg/dl) üstünde çıkmıştır; yani kontrol grubu dışındaki tüm sıçanlarda Tacrolimus nefrotoksisitesine sekonder olarak üremi gelişmiştir.

Çalışma sonunda gruplar arasında ve grup içinde önce ve sonra kıyaslandığında serum potasyumunda fark saptanmamıştır. Yani Tacrolimus tedavisi hiperpotasemiye sebep olmamıştır ve tedaviye kinapril ya da valsartan eklenmesinin serum potasyum değerleri üzerine ek bir etkisi ortaya çıkmamıştır. Yine gruplar arasında idrar volümü, kreatinin klirensi ve sodyum düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

Daha önce yapılmış benzer çalışmalarda, Tacrolimusa bağlı renal yapısal hasar patogeneğinde, TGF- β 1 (4,11) PDGF'nin (4) önemli rol oynadığı saptanmıştır. Var olan az sayıda çalışmada hep bu iki sitokinin ekspresyonundaki artış değerlendirilmiştir. Ancak TGF- β 1 gibi profibrotik bir sitokin olan VEGF ve IL-6 düzeyleri ve antifibrotik bir sitokin olan BMP-7 düzeyleri Tacrolimus nefrotoksisitesinde hiç araştırılmamıştır. Bu nedenle etki mekanizmasının değerlendirilmesi için TGF- β 1, PDGF, VEGF, IL-6 ve BMP-7 düzeyleri immünohistokimya boyamaları ile değerlendirilmiştir.

Hemotoksilen-Eosin ve PAS boyası ile yapılan histopatolojik çalışmalarımız sonucunda Tacrolimus alan tüm sıçanlarda 28 gün içinde, nefrotoksisitenin karakteristik bulguları olan intersitisyel mononükleer hücre infiltrasyonu, intersitisyel ödem, tubuler düzensizlik fokal vakuolizasyon, renal tubullerde mikrokalsifikasyon (76,159), tubulit gelişimi, afferent arteriolde hafif ve belirgin derecede hyalen madde birikimi görülmüştür. Trikrom-Mason boyası ile yaygın intersitisyel fibrozis tespit edilmiştir. Kreatinin klirensinde anlamlı değişiklik saptanmamasına rağmen Tacrolimus'u tek başına ya da RAS blokeri ilaçla birlikte alan tüm sıçanlarda çeşitli derecelerde nefrotoksisite bulgularının gelişmiş olması yapısal değişikliklerin henüz işlevsel bosukluğa yol açmadığı ya da kreatininin klirensinin GFR'yi çok güvenilir bir şekilde yansıtmadığı şeklinde yorumlanabilir. Nitekim 1998'de Laskow ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 23 hastanın 7'sinde (%30) Tacrolimus nefrotoksisitesinin histolojik bulguları saptanmış olmasına rağmen serum kreatinininde değişiklik olmamıştır.

Çalışmamız sonucunda, Tacrolimus alan sıçanların böbrek dokularındaki glomerüller ve tubulointersitisyel alanda TGF, PDGF, VEGF, IL-6 ve BMP-7 immünekspresyonları değerlendirildiğinde; fibrozisle birlikte TGF- β , PDGF, IL-6 ve VEGF immünekspresyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı artış saptanmıştır (p değerleri sırasıyla: $p<0.0001$, $p<0.05$, $p<0.0001$, $p<0.0001$). BMP-7 immünekspresyonunda ise istatistiki anlamlılık düzeyine ulaşmamakla birlikte kontrol grubuna göre azalma eğilimi görülmüştür.

Tacrolimus nefrotoksisitesinde TGF- β (4,11) ve PDGF'nin (4) arttığı daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir. Bizim çalışmamız bu açıdan literatürle uyumlu bulunmuştur. VEGF fibroziste etkili olduğu düşünülen diğer bir sitokindir (160). Literatürde Tacrolimus nefrotoksisitesinde VEGF düzeyini araştıran yayın bulunmamaktadır. Çalışmamız ayrıca Tacrolimus nefrotoksisitesinde IL-6 ekspresyonunu inceleyen ilk çalışma olması açısından da önem taşımaktadır.

Tacrolimus böbrek transplantasyonunda etkili primer immunosupresif bir ajandır. (161) İmmunosupresif etkisi in vitro (162,163) ve in vivo olarak (164) CsA dan 10-100 kat daha güçlüdür. Böbrek transplantasyonunda primer immünsupresyonda ve daha önceki rejimlerin rejeksiyonu engellemede etkisiz olduğu hastalarda erken 'kurtarma' tedavisinde ya da yan etki ya da toksisite nedeniyle kullanılmadığı hastalarda kullanılır (38). Tacrolimus'un sebep olduğu akut nefrotoksisite böbrek transplantasyonu sonrasında karşılaşılan en önemli problemdir (29). Bu yan etki allograft sürvisini etkilemekte ya da diğer solid organ ya da kemik iliği transplat alıcılarında son dönem böbrek yetmezliğine sebep olmaktadır (74,165,166). Nefrotoksisite sıklığı karaciğer transplant alıcılarında %18-42; böbrek transplant alıcılarında ise diğer kalsinörin inhibitörü olan CsA'ya benzer (3,4,5) ya da ondan daha fazla olduğuna (40,48) ilişkin veriler mevcuttur; sıklığı %17 (49) ile % 46.2 (50) arasında değişmektedir.

Tacrolimus nefrotoksisinde patogenezi multifaktöriyeldir (8). Hem in vivo hem in vitro çalışmalarda renal ve sistemik vasokonstriksiyon, artmış endotelin salınımı, azalmış nitrik oksit üretimi, TGF- β ekspresyonunda artış gösterilmiştir (74,75). Renin-angiotensin sisteminin aktivasyonu, artmış renin immünreaktivitesiyle birlikte JGA hiperplazisiyle desteklenen diğer bir mekanizmadır. Sıçanlarda Tacrolimus'un sebep olduğu progresif çizgili intersitisyel fibrozis gelişiminde artmış plasma renin aktivitesi ile birlikte, sodyum depleksiyonunun kritik rol oynaması, kronik Tacrolimus nefrotoksisitesindeki yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin gelişiminde RAS'ın rol oynadığını göstermektedir (28). Holmer ve

arkadaşları (167) düşük tuzlu diyetle beslenen hayvanlarda PRA (plasma renin aktivitesi) ve renal renin mRNA'sında artış saptamışlardır; bu hayvanlarda renal renin mRNA düzeyleri PRA'deki değişikliklere paralel gitmektedir. Tuzdan fakir beslenme, RAS'nin aktivasyonu ve Ang II'nin sebep olduğu vasokonstriksiyon nedeniyle medullar iskemiye katkıda bulunmaktadır (28). Ayrıca Ang II vasokonstriktif etkisinden bağımsız mekanizmalarla renal büyüme faktörü olarak etki etmektedir. Ang II'nin mesengial ve proksimal tubuler hücreler üzerinde proliferatif ve hipertrofik etkilerinin gösterilmiş olması bu peptidin renal bir sitokin olduğunu düşündürmüştür (168).

Deneysel ve klinik bulgular CsA ile de RAS aktivasyonunu göstermiştir (169,170). Siklosporin nefrotoksisitesinde ACE inhibitörlerinin ve Ang II reseptör blokerlerinin GFR ve hemodinamide çok az düzeltme yapmasına rağmen fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (171). Siklosporinle benzer mekanizmalarla etki gösteren(172) ve onun gibi kalsinörin inhibitörü olan Tacrolimus'un oluşturduğu nefrotoksisitede daha önce sınırlı sayıda çalışmada kalsiyum kanal blokerleri , Ang II reseptör blokerleri (5), L aminoasitler denenmiş (173), bu ajanlarla renal fonksiyonda düzelme saptanmıştır. Fakat literatürde bugüne dek ACE inhibitörü ve Ang II reseptör blokeri ile RAS blokajının Tacrolimus nefrotoksisitesinde böbrekte gelişen işlevsel ve yapısal hasar üzerine etkisini değerlendiren ve karşılaştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızın sonunda Tacrolimus'a bağlı olarak böbrekte oluşan yapısal hasar bulgularından biri olan tubulointersitisyel fibröz bulgularının RAS blokajı (Kinapril ve Valsartan tedavisi) ile önemli derecede gerilediği saptanmıştır. Özellikle Kinapril afferent arteriolopati gelişimi üzerinde olumlu etki göstermektedir, aynı olumlu etki Valsartan ile gözlemlenmemiştir. Yine Kontrol grubundaki sıçanların kesitlerin hiçbirinde intersitisyumda mononükleer hücre infiltrasyonu saptanmazken, Tac grubunda % 75 oranında mononükleer hücre infiltrasyonu saptanmıştır. Kinapril (%12.5) ve Valsartan(%14.3) intersitisyumda mononükleer hücre infiltrasyonunda belirgin olarak azaltmaktadır. (p<0.005) (Şekil-12) Çalışmamızda elde edilen veriler, Tacrolimus ile gelişen böbrek hasarının profibrotik sitokinler olan TGF- β , PDGF, VEGF, IL-6'nın glomerüller ve tubuler ekspresyonunda meydana gelen artma ve yakın dönemde keşfedilen antifibrotik özelliklere sahip bir sitokin olan BMP-7'nin glomerüller ve tubuler ekspresyonunda meydana gelen azalmayla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Glomerüller ya da nonglomerüller kaynaklı birçok böbrek hastalığı tubulointersitisyel alanda genişleme ve fibrozisle sonuçlanır (174). Fibrozis genellikle dokudaki parenkimal hücrelerin yüksek derecede differansiye olması pahasına stromal elementlerin genişlemesiyle oluşur (174). Renal hastalıklarda stromal elementlerin genişlemesi böbrek mimarisini kesintiye uğratarken sıvı ve solüt değişimi de bozulur.

Renal intersitisyumdaki düzensizliğe ve sonuçta fibrozis gelişimine katkıda bulunan stromal elementler miyofibroblastlar, monositler, ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin fazla yapımıdır (174). Veriler tubulointersitisyel fibrozisin birçok durumda TGF- β 'a bağımlı bir süreç olduğunu göstermektedir (16). TGF- β böbrekte önemli bir profibrojenik ajan olarak bilinmektedir (123).

Siklosporin ve Tacrolimus tedavisi, IL-2 benzeri proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyon ve transkripsiyonu üzerindeki inhibitör etkileri dışında TGF- β 'nın artmış ekspresyonuna neden olur (27). Belirgin immunosupresif özellikleri olan bu sitokinin ayrıca dokuda fibrozis gelişimini ve matriks proteinlerinin depozisyonu artırıcı özellikleri vardır. Kalsinörin inhibitörlerinin intragraft TGF- β düzeylerini arttırdığı ve allograftta fibroz geliştirdiği gösterilmiştir (27). Bu etkilerin her iki kalsinörin inhibitöründe de bulunmakla birlikte, hangisinin TGF- β ekspresyonunu daha fazla arttırdığı konusu ile ilgili çelişkili yayınlar bulunmaktadır (1,11,35).

Çalışmamızda RAS blokajı (kinapril ve valsartan tedavisi) TGF- β ekspresyonunda azalmaya sebep olmuştur. Bu açıdan Kinapril Valsartan'a relatif olarak üstün bulunmuştur. Son zamanlarda Ang II'nin, proksimal tubuler hücrelerde sellüler hipertrofiyi, kollajen IV mRNA ekspresyonu ve protein sentezini stimüle eden lokal büyüme faktör fonksiyonu ve sıçan mesengial hücrelerinde biglikan, fibronektin, kollajen I mRNA ve proteinini uyardığı gösterilmiştir. Ang II'nin büyüme faktör fonksiyonlarının çoğu TGF- β aracılığı iledir. Kültür mesengial hücrelerine Ang II eklenmesi, TGF- β mRNA ve aktif TGF- β proteinini artırır. Ayrıca Ang II'nin matriks protein sentezi üzerindeki stimulatör etkileri TGF- β nötralize eden antikörlerin eklenmesi ile bloke edilebilir. Ang II'nin kardiak endotel hücreleri ve fibroblastlardan TGF- β üretimini stimüle etmesi, sistemik hipertansiyonun eşlik ettiği kardiyak hipertrofi ve vasküler yeniden yapılanmada (remodeling), AII- TGF- β aksının önemli bir rol oynadığını gösterir. Angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri kalp ve böbrekte hem hemodinamik mekanizmalarla basınç ve akımı azaltarak, hem de antifibrotik mekanizmalarla fibrozisi azaltır (88).

Gross ve arkadaşlarının (175) COL4A3-/- farelerde (fenotipik olarak Alport sendromuna benzeyen progresif renal fibrozis modeli ACE inhibitörü (Ramipril) ve Ang II (Kandesartan) tip1 reseptör antagonistlerinin antifibrotik gücünü karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada TGF- β , konnektif doku büyüme faktörü, metalloproteinazlar ve ekstrasellüler matriks proteinlerini azaltması açısından ramiprilin antifibrotik potansiyeli daha yüksek bulunmuştur. Ramipril tedavisi TGF- β 'yı %200 (microarray analiz), Candesartan ise % 80 azaltmıştır. Bizim çalışmamızda Tacrolimus nefrotoksitesisi gelişen sıçanlarda hem kinapril hem de Valsartan'ın TGF- β ekspresyonunu azaltma açısından olumlu etkileri saptanmış, bu etki açısından Kinapril görece olarak Valsartan'a üstün bulunmuştur. RAS blokajının Ang II' nin etkilerini bloke ederek TGF- β ekspresyonunu azaltması mümkündür.

PDGF hem insan hastalıklarında hem de deneysel modellerde progresif renal hasar patogeneğinde sıkça suçlanmaktadır. PDGF artmış ekspresyonunun glomerüler ve diğer renal hastalıklardaki patolojik önemi daha önce bildirilmiştir. PDGF, hem renal hücreler ve hem de göç yoluyla gelen makrofajlar tarafından sentezlenir (100). PDGF etkileri mesenjiyal hücre proliferasyonunu stimüle etmek, ekstrasellüler matriks (ECM) sentezini arttırmak ve TGF- β 'nın ekspresyonunu arttırmaktır. Ayrıca, *angiotensin II*, endotelin, inflamatuvar sitokinler, ileri glikozillenmiş son ürünleri içeren renal hastalıkta suçlanan çeşitli faktörlere cevap olarak da, PDGF düzeyleri artar (100). Tacrolimus nefrotoksitesisinde de PDGF'nin arttığı daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir. (4) Bizim çalışmamızda literatürle uyumlu olarak Tacrolimus uygulaması ile PDGF B zincirinin glomerüler ve tubuler ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre PDGF B ekspresyonundaki artışın Tacrolimus nefrotoksitesisinde önemli bir lezyon olan tubulointersitisyel fibrozis gelişiminde etkili olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca Kinapril ve Valsartan ile RAS blokajı yapılan iki grupta PDGF B glomerüler ve tubuler ekspresyonunun belirgin olarak azaldığı hatta kontrol grubuna yaklaştığı saptanmıştır. RAS blokajının bu olumlu etkileri iki ilaçta da birbirine benzer bulunmuştur. Angiotensin II'nin vasküler düz kas hücre kültüründe PDGF A ve B zincirinin transkripsiyonunu arttırarak, ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (176). RAS blokajı ile PDGF ekspresyonunun azalmasının olası mekanizması, Tacrolimus nefrotoksitesisinde aktif hale gelmiş RAS'nin aktif peptidi olan angiotensin II'nin bloke edilerek PDGF ekspresyonu artışı yapmasının engellenmesidir.

BMP-7 son dönemde TGF- β ailesine mensup, ilerleyici fibrozis ile seyreden böbrek hastalıklarında TGF- β 'nın profibrojenik etkilerini ortadan kaldıran ve böylece fibrozis ilerlemesini durduran yeni bir sitokindir. (15,16) Hasarlanmış böbrekte bir çok endojen

büyüme ve hemostatik faktörün kaybı ya da üretiminde azalma sebebiyle, tubul hücrelerinin proliferasyonu inhibe olur. BMP-7, işte bu kaybedilen faktörlerden biridir (177). Aynı zamanda BMP-7 böbrek gelişiminde anahtar bir morfojenik sinyaldir (107). Akut iskemik hasar, tubulointersitisyel fibroz, diyabetik nefropati, lupus nefriti, renal osteodistrofideki vasküler kalsifikasyon gibi iyi bilinen renal hastalıkların hayvan modellerinde BMP-7'nin rolü araştırılmış ve çoğunda patogeneizde rol oynadığı gösterilmiştir. Kemirgen hayvanlarda (rodent) unilateral obstruksiyon modelinde obstruksiyonla aynı anda başlanarak 5 gün süreyle verilen BMP-7'nin renal fonksiyonu koruduğu, tubuler atrofiyi önlediği ve obstruksiyondan sonraki ilk 5 gün içinde gelişen tubulointersitisyel inflamasyon ve fibrozisi azalttığı gösterilmiştir. BMP-7, apoptozunun uyarılmasını engelleyerek renal tubuler epitelyal bütünlüğün devamını sağlamış ve epitelyal-mesenkimal transdiferansiyasyonu inhibe (15) etmiştir (17).

Literatürde Tacrolimus nefrotoksisitesinde BMP-7 ekspresyonunu değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Kalsinörin inhibitörlerinde BMP-7 ekspresyonunu değerlendiren tek çalışma siklosporin ile ilişkilidir (178). Bu çalışmada siklosporin nefrotoksisitesinde BMP-7 ekspresyonu azalmış olarak bulunmuş, ACE inhibitörü(kinapril)'nün BMP-7'yi arttırdığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda, siklosporin ile aynı gruptan bir ajan olan Tacrolimusun oluşturduğu nefrotoksisitede de BMP-7 ekspresyonunu azalmış olarak bulunmuş; fakat bu azalma istatistiki anlamlılığa ulaşmamıştır. Bu sonucun alınmasında örneklem büyüklüğünün yetersizliği rol oynamış olabilir.

Çalıştığımız diğer bir sitokin olan IL-6'nın glomerüller hücreler üzerinde proliferatif etkileri olabileceği gösterilmiştir (134,135). İn vivo ve in vitro çalışmalar IL-6'nın mesengial hücre proliferasyonunun otokrin bir düzenleyicisi olduğunu desteklemiştir (136). Glomerüldeki IL-6 boyanma yoğunluğu glomerül hücre sayısındaki artışla koreledir (136). Bu veriler proliferatif glomerülonefritlerin patogenezinde, etkilenmiş glomerüllerdeki mesengial hücrelerin fazla miktarda ürettiği IL-6'nın rol oynadığını göstermektedir (136,137). Çalışmamızda nefrotoksisite gelişen tüm gruplarda (Grup 2, Grup 3, Grup 4) IL-6 immünekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ($p < 0.0001$). IL-6'nın mesengial hücreler üzerinde daha çok proliferatif etkileri olduğu bilindiğinden, çalışmamızda IL-6'nın artmış ekspresyonu bu fibrojenik sitokinin Tacrolimus nefrotoksisitesi patogenezinde farklı mekanizmalarla etkili olduğunu düşündürmektedir.

Ang II ayrıca mesengial ve düz kas hücre kültürlerinde IL-6'nın salınımını ve mRNA ekspresyonunu artırır. (138,139). Ortega ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Ang II'nin infüzyon ile verildiği sıçanlarda IL-6 üretiminin arttığını, mesengial hücreler ağırlıkta olmak üzere glomerüler hücrelerde, tubuler hücrelerde, ve renal arterlerde(ana olarak vasküler düz kas hücreleri) eksprese edildiğini, böylece Ang II'nin in vivo olarak IL-6 üretimini arttırdığını gösterilmiştir. Literatürde anti IL-6 reseptör antikolarıyla IL-6 sinyalinin blokajının Ang II'nin tetiklediği hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir (138). Çalışmamızda hem Kinapril hem Valsartan IL-6 ekspresyonunu azaltmaya sebep olmuştur. Ang II etkilerinin blokajının IL-6 ekspresyonundaki artışı engellemesi olası mekanizma olarak düşünülmüştür. Bu olumlu etki Valsartan'da Kinapril'e göre relatif olarak daha üstün bulunmuştur. Çalışmamız Tacrolimus nefrotoksisitesinde IL-6 ekspresyonunu inceleyen ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır.

VEGF fibroziste etkili olduğu düşünülen diğer bir sitokindir (159). Tubuler hücreler, hipoksi ya da hasara, VEGF üretimi ile yanıt verirler; VEGF, peritubuler kapillerlerin proliferasyonunu stimüle ederek tubuler hasarı onarır (140); bu sebeple VEGF'nin doku iskemi süresince endotel hücreleri için proliferatif 'sağkalımcı faktör' olduğu kabul edilir (143,144). VEGF sisteminin bir çok nefropati tipinde etkilendiği gösterilmiş olup (145) VEGF'ü manipüle eden girişimlerin terapötik açıdan faydalı olabileceği öne sürülmüştür (140). Literatürde Tacrolimus nefrotoksisitesinde VEGF düzeyini araştıran yayın bulunmamaktadır. VEGF bizim çalışmamızda Tacrolimus nefrotoksisitesi gelişen tüm gruplarda kontrol grubuna oranla artmış bulunmuştur. (p<0.0001) Kinapril, VEGF ekspresyon artışını azaltması açısından Valsartan'a göre görece olarak üstün görülmektedir.

Klasik olarak lokal ve sistemik hemodinamik regülasyona katılan vasoaktif bir ajan olduğu bilinen Ang II'nin, son dönemde renal patolojide aktif rol oynayan gerçek bir sitokin olarak kabul edilmesi gerektiği düşünülmektedir (24,25,26). Ang II, hücre tipine bağımlı olarak hiperplazi ve hipertrofiyi indükleyen renal büyüme faktörü olarak etki gösterir. Bu vasoaktif peptid mesengial ve tubular hücreleri ve intersitisyel fibroblastları, aktive ederek fibronektin, laminin ve kollagen gibi ECM proteinlerinin ekspresyonunu ve sentezini artırır (19). Bu etkilerden bazılarını TGF- β gibi diğer büyüme faktörlerinin salınımı aracılık eder (153).

İntakt sıçanlara Ang II infüzyonu glomerüler transkapiller basınçta artışa ve sonuçta progresif glomerüler sklerozise sebep olmaktadır (179,180). Ang II etkilerinin ACE inhibitörleri ve angiotensin tip I (AT1) antagonistleri ile bloke edilmesi, insanlarda böbrek

hasarının bir çok modelinde proteinürüyi, TGF- β gibi gen ekspresyonu artışını, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrozisi önlemektedir (24,25,26). Ang II, ayrıca, mononükleer hücreleri aktive eder, ve proinflamatuvar mediatörleri artırır (sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri, nükleer faktör-kB) (153,181,182). Çalışmamızda hem ACE inhibitörü kinapril, hem de Ang II reseptör blokeri Valsartan intersitisyumda mononükleer hücre infiltrasyonunda belirgin azalma yapmıştır ($p<0.005$).

Sıçanlara kronik olarak Ang II infüze edildiğinde tubuler atrofi ve dilatasyon, silendir formasyonu, interstisyel monosit infiltrasyonu ile birlikte tubulointerstisyel hasar ve tip IV kollajen depozisyonu ile birlikte intersitisyel fibrozis gelişmektedir (183). Kültürde renal intersitisyel fibroblastlar AT1 reseptörü eksprese ederler, Ang II stimülasyonu sonrası TGF- β aracılıklı mekanizmalarla hücre proliferasyonunda ve fibronektin gibi ECM proteinlerinin ekspresyonu ve sentezinde artış görülür (21). TGF- β ve PDGF B'nün fibroblastların miyofibroblastlara transformasyonunu indüklediği gösterilmiştir (184,185). Bu etkileri Ang II ile TGF- β geninin upregülasyonunun sonucudur; renal tubuler hücrelerde, fibroblastlarda ve diğer hücrelerde TGF- β üretimini stimüle eder (186). Tubuler epitelyum hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar gibi renal hücrelerde Ang II sentezleyen sistemin varlığı daha önceki raporlarda gösterilmiştir (186). Bu sonuçlar lokal intersitisyel intrarenal RAS'ın, inflamatuvar proses ve progresif renal hasarda önemli rol oynadığını göstermektedir.

RAS'ın blokajının renoprotektif olduğu çok sayıda hayvan ve insan çalışmalarıyla doğrulanmıştır. RAS blokerlerinin renoproteksiyonu, intraglomerüler kapiller basıncın azalmasıyla, antiproteinürik etkileriyle ve nonhemodinamik etkileriyle ilişkilidir (186). Ek olarak RAS'ın nonhemodinamik etkilerinin daha iyi anlaşılması renal fibrozis tedavilerinin iyileşmesine yol açmıştır (153). Ang II nin güçlü proinflamatuvar etkileri vardır. Ang II aktivitesinin blokajı, ayrıca, makrofaj infiltrasyonu ve miyofibroblast proliferasyonunu da belirgin olarak inhibe eder ve ayrıca PDGF ve TGF beta ekspresyonunu azaltır (186). Çalışmamızda hem ACE hem Ang II reseptör blokeri ile tedavi edilen sıçanlarda PDGF ekspresyonunda azalma olmuştur.

Çalışmamızın sonucunda Tacrolimus verilen sıçanlarda Tacrolimus nefrotoksisitenin tipik histolojik bulgularının geliştiği, bu bulgulardan en önemlilerinden biri olan hyalen arteriolopatiyi Kinapril tedavisinin belirgin olarak azalttığı, Valsartan'ın ise hyalen arteriolopati üzerinde pek etkili olmadığı gözlenmiştir. Diğer önemli bulgu olan intersitisyel fibrozis üzerinde, Kinapril'in fibrozisi azaltıcı etkisinin olduğu ve bu etkinin Valsartan

tedavisinden görece olarak üstün olduğu saptanmıştır. Her iki ilaç da glomerül ve intersitisyumdaki mononükleer hücre infiltrasyonunu ve vakuolizasyonu belirgin şekilde ve birbirlerine benzer oranlarda azaltmıştır. Ayrıca, Tacrolimus nefrotoksitesisi geliştirilmiş bu sıçan modelinde, Kinapril ve Valsartan tedavi gruplarında TGF- β , PDGF, IL-6, ve VEGF immünekspresyonları belirgin şekilde artmış; BMP-7 ise azalma eğiliminde olmasına rağmen fark istatiki anlamlılığa ulaşmamıştır. Kinapril ve Valsartan tedavisi TGF'yi, PDGF'yi birbirine benzer oranda ve belirgin şekilde azaltmış; VEGF'yi azaltma konusunda Kinapril, IL-6'yı azaltma konusunda relatif olarak Valsartan üstün gözükmiştir.

Sitokin ekspresyonlarını hemen hemen benzer şekilde azaltıyor görünmelerine rağmen ACE inhibitörü Kinapril'in hyalen arteriolopati üzerinde belirgin ve intersitisyel fibrozis üzerindeki görece olarak daha olumlu etkisi, dönüştürücü enzim inhibitörlerinin anjiotensin II blokajı yanında, kinin aktivitesini arttırması ve vasodilatatör prostaglandinlerin aktivitesini arttırması ile izah edilebilir (187). Bir başka olası açıklama da, ACEI Ang I'in Ang II'ye dönüşümünü azaltırken, juksta glomerüler apparatus (JGA) üzerindeki negatif feedback inhibisyonun kaybından dolayı renin düzeyleri kompensatuar olarak artar. Ang tip1 reseptör antagonistlerinde ise JGA üzerindeki Ang II aracılığı ile oluşan normal feedback inhibisyon devam ettiğinden hem Ang II yükselir, hem de renin ve Ang II üretimi artar. İnhibisyon düzeyindeki bu farklar ACEI ve AT1 reseptör blokeri ilaçların terapötik etkilerinin farklılığını açıklayabilir (188).

Sonuçlarımız Tacrolimus nefrotoksitesinde profibrojenik sitokinler olan TGF- β , PDGF, VEGF ve IL-6'nın arttığını, antifibrotik bir sitokin olan BMP-7 nin istatistiki anlamlılığa ulaşmasa da azaldığını göstermektedir. Çalışmamızda, ayrıca RAS blokajının Tacrolimus nefrotoksitesinde profibrojenik sitokin ekspresyonunu azaltma özellikleri olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar bu sitokinleri manipüle eden girişimlerin terapötik açıdan faydalı olabileceğini dolaylı olarak düşündürmektedir. Bu yönde çalışmaların sürdürülmesi özellikle organ transplantasyonunda akut reddin önlenmesindeki etkinliği nedeniyle kullanımı son derecede önemli olan Tacrolimus'un kullanımını kısıtlayan en önemli sorunun çözülmesine yardımcı olacaktır.

7-KAYNAKLAR

1. Ochiai T, Ishibashi M, Fukao K, Takahashi K, Endo T, Yokoyama I, Uchida K, Ohshima S, Takahara S, Morozumi K, et al. Japanese multicenter studies of FK 506 in renal transplantation. Japanese FK 506 Study Group. *Transplant Proc.* 1995 Feb;27(1):50-3.
2. Jurewicz WA. Tacrolimus versus cyclosporin immunosuppression: long-term outcome in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 May;18 Suppl 1:i7-11.
3. Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of Tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation.* 1997 Apr 15;63(7):977-83.
4. Jeong HJ, Kim YS, Hong IC. Vascular endothelin, TGF-beta, and PDGF expression in FK506 nephrotoxicity of rats. *Transplant Proc.* 1998 Nov;30(7):3596-7.
5. Bennett WM. The nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Clin Nephrol.* 1995 Jan;43 Suppl 1:S3-7.
6. Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickleit V, Ryffel B. The side-effects of cyclosporine-A and Tacrolimus. *Clin Nephrol.* 1998 Jun;49(6):356-63.
7. Bennett WM: The nephrotoxicity of new and old immunosuppressive drugs. *Renal Failure* 20:687, 1998
8. Maes BD(B.D. Maes), Y. Vanrenterghem. Cyclosporine: Advantages Versus Disadvantages Vis-à-vis Tacrolimus. *Transplant Proc.* 2004 36(Suppl 2S)40S-49S
9. Brenner BM(Barry M. Brenner). *The Kidney Fifth Edition Volume II* page: 2594
9. Ignatz RA, Massague J, TGF- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. *J Biol. Chem* 261 of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. *J Biol. Chem* 261: 4337-4345, 1986(abstract)
10. Floege J, Johnson RJ: Multiple Roles of Platelet Derived Growth Factor in renal disease. *Miner Electrolyte Metab.* 21:271-282, 1995 (abstract)
11. Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S. Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with Tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2002 Dec;62(6):2257-63.
12. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA: Production of extracellular matrix by glomerular cells is regulated by TGF- β 1. *Kidney Int.* 41: 1213-1221, 1990

13. Schultz PJ, D'Corleto PE, Silver BJ et al: Mesangial cells express PDGF mRNA and proliferate in response to PDGF. *Am. J Physiol.* 255:F674-684, 1988(abstract)
14. Throckmorton DC, Brogden AP, Min B, Rasmussen H, Kashgarian M. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. *Kidney Int.* 1995 Jul;48(1):111-7.
15. Klahr S: The bone morphogenetic proteins (BMPs). Their role in renal fibrosis and renal function. *J Nephrol.* 2003 Mar-Apr;16(2):179-85.
16. Lund RJ, Davies MR, Hruska K: Bone Morphogenetic protein-7: an anti-fibrotic morphogenetic protein with therapeutic importance in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11:31-36
17. Hruska KA, Guo G, Wozniak M, Martin D, Miller S, Liapis H, Loveday K, Klahr S, Sampath TK, Morrissey J. Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Jul;279(1):F130-43.
18. Wang S, Hirschberg R. Loss of renal tubular BMP-7 during the evolution of experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:655
19. Egido J. Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney Int.* . 1996; 49: 578-597.
20. Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol.* . 1993; 3: 1531-1540.
21. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* . 2001; 10: 321-329.
22. Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor- β and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension.* . 1998; 31: 181-188.
23. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 1994 Jun;93(6):2431-7.
24. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* . 1995; 47: 1285-1294.
25. Ruiz-Ortega M, González S, Serón D, Condom E, Bustos C, Largo R, González E, Ortiz A, Egido J. ACE inhibition reduces proteinuria, glomerular lesions and extracellular matrix production in a normotensive rat model of immune complex nephritis. *Kidney Int.* . 1995; 48: 1778-1791.
26. Wu LL, Cox A, Roe CJ, Dziadek M, Cooper ME, Gilbert RE. Transforming growth factor β 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int.* . 1997; 51: 1555-1567.

27. M.H. Kapturczak, H.U. Meier –Kriesche, B. Kaplan: Pharmacology of Calcineurin Antagonists. *Transplantation Proceeding*. 2004 36 (Suppl 2S), 25S-32S
28. Andoh TF, Burdmann EA, Lindsley J, Houghton DC, Bennett WM. Functional and structural characteristics of experimental FK 506 nephrotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995 Sep;22(9):646-54.
29. Kayaalp O, Rasyonel Tedavi Yöntünder Tıbbi Farmakoloji 2002; 420-422
30. Schneck FX, Jordan ML, Jensen CW, Shapiro R, Tzakis A, Scantlebury VP, Ellis D, Gilboa N, Simmons RL, Hakala TR, et al. Pediatric renal transplantation under FK-506 immunosuppression. *J Urol*. 1992 Jun;147(6):1585-7.
31. Busuttil RW., Holt CD. Tacrolimus is Superior to Cyclosporine in Liver Transplantation. *Transplant Proc*. 1998 30,2174-2178
32. Kay JE, Doe SE, Benzie CR. The mechanism of action of the immunosuppressive drug FK-506. *Cell Immunol*. 1989 Nov;124(1):175-81.
33. Woodle ES, Perdrizet GA, Brunt EM, So SK, Jendrisak MD, McCullough CS, Vehe KL, White HM, Peters MG, Mohanakumar T, et al. FK506: inhibition of humoral mechanisms of hepatic allograft rejection. *Transplantation*. 1992 Aug;54(2):377-81.
34. Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Nov 30;696:9-19.
35. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care*. 2001 Dec;7(6):384-9.
36. Perkins DL, Carpenter CB: *Immunology of Transplantation. The Kidney 1996*, edited by Brenner BM, USA. Fifth Edition, pp: 2594
37. Venkataramanan R, Jain A, Warty VW, Abu-Elmagd K, Furakawa H, Inventarza O, Fung J, Todo S, Starzl TE. Pharmacokinetics of FK 506 following oral administration: a comparison of FK 506 and cyclosporine. *Transplant Proc*. 1991 Feb;23(1 Pt 2):931-3.
38. Laskow DA, Neylan JF 3rd, Shapiro RS, Pirsch JD, Vergne-Marini PJ, Tomlanovich SJ. The role of Tacrolimus in adult kidney transplantation: a review. *Clin Transplant*. 1998 Dec;12(6):489-503.
39. Smith JM, Nemeth TL, McDonald RA: Current immunosuppressive agents: efficacy, side effects, and utilization. *Pediatr Clin North Am*. 2003 Dec;50(6):1283-300.
40. Porayko MK, Textor SC, Krom RA, Hay JE, Gores GJ, Richards TM, Crotty PH, Beaver SJ, Steers JL, Wiesner RH. Nephrotoxic effects of primary immunosuppression with FK-506 and cyclosporine regimens after liver transplantation. *Mayo Clin Proc*. 1994 Feb;69(2):105-11

41. [No authors listed] Japanese study of FK 506 on kidney transplantation: results of late phase II study. *Transplant Proc.* 1993 Feb;25(1 Pt 1):649-54.
42. Klintmalm GB, Goldstein R, Gonwa T, Wiesner RH, Krom RA, Shaw BW Jr, Stratta R, Ascher NL, Roberts JW, Lake J, et al. Use of FK 506 for the prevention of recurrent allograft rejection after successful conversion from cyclosporine for refractory rejection. US Multicenter FK 506 Liver Study Group. *Transplant Proc.* 1993 Feb;25(1 Pt 1):635-7.
43. Mochizuki M, Masuda K, Sakane T, Ito K, Kogure M, Sugino N, Usui M, Mizushima Y, Ohno S, Inaba G, et al. A clinical trial of FK506 in refractory uveitis. *Am J Ophthalmol.* 1993 Jun 15;115(6):763-9.
44. Thomson AW, Carroll PB, McCauley J, Woo J, Abu-Elmagd K, Starzl TE, Van Thiel DH. FK 506: a novel immunosuppressant for treatment of autoimmune disease. Rationale and preliminary clinical experience at the University of Pittsburgh. *Springer Semin Immunopathol.* 1993;14(4):323-44.
45. Feutren G, Mihatsch MJ. Risk factors for cyclosporine-induced nephropathy in patients with autoimmune diseases. *International Kidney Biopsy Registry of Cyclosporine in Autoimmune Diseases. N Engl J Med.* 1992 Jun 18;326(25):1654-60.
46. Myers BD, Sibley R, Newton L, Tomlanovich SJ, Boshkos C, Stinson E, Luetscher JA, Whitney DJ, Krasny D, Coplon NS, et al. The long-term course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. *Kidney Int.* 1988 Feb;33(2):590-600.
47. Todo S, Fung JJ, Starzl TE, Tzakis A, Demetris AJ, Kormos R, Jain A, Alessiani M, Takaya S, Shapiro R. Liver, kidney, and thoracic organ transplantation under FK 506. *Ann Surg.* 1990 Sep;212(3):295-305; discussion 306-7.
48. Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, Besse T, Grabensee B, Klein B, Eigler FW, Heemann U, Pichlmayr R, Behrend M, Vanrenterghem Y, Donck J, van Hooff J, Christiaans M, Morales JM, Andres A, Johnson RW, Short C, Buchholz B, Rehmert N, Land W, Schleibner S, Forsythe JL, Talbot D, Pohanka E, et al. Multicenter randomized trial comparing Tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation.* 1997 Aug 15;64(3):436-43.
49. Katari SR, Magnone M, Shapiro R, Jordan M, Scantlebury V, Vivas C, Gritsch A, McCauley J, Starzl T, Demetris AJ, Randhawa PS. Clinical features of acute reversible Tacrolimus (FK 506) nephrotoxicity in kidney transplant recipients. *Clin Transplant.* 1997 Jun;11(3):237-42.

50. Sugito K, Morozumi K, Oikawa T. A comparative study of clinicopathologic characteristics of renal allografts under cyclosporine and FK506 immunosuppression. *Transplant Proc.* 1996 Jun;28(3):1335-7.
51. Kahan BD, Ponticelli C. 2001 Principles and Practice of Renal Transplantation P 373-385 and 511-524
52. de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Pharmacology of immunosuppressive medications used in renal diseases and transplantation. *Am J Kidney Dis.* 1996 Nov;28(5):631-67.
53. Mihatsch MJ, Gudat F, Ryffel B, Thiel G. 1994 Cyclosporine nephropathy. In: Tisher CC, Brenner BB (eds) *Renal Pathology J. B. Lippincott Company* 2. edition, Vol.11, p 1641-1682
54. Kliem V, Brunkhorst R. Tacrolimus in kidney transplantation. A clinical review. *Nephron.* 1998;79(1):8-20.
55. Andoh TF, Burdmann EA, Fransechini N, Houghton DC, Bennett WM. Comparison of acute rapamycin nephrotoxicity with cyclosporine and FK506. *Kidney Int.* 1996 Oct;50(4):1110-7.
56. Clinicopathological evaluation of kidney transplants in patients given a fixed dose of FK506. *Transplantation* 23:3111-3115
57. [No authors listed] Morphological characteristics of renal allografts showing renal dysfunction under FK 506 therapy: is graft biopsy available to reveal the morphological findings corresponding with FK 506 nephropathy? Japanese FK 506 Study Group. *Transplant Proc.* 1993 Feb;25(1 Pt 1):624-7.
58. Demetris AJ, Fung JJ, Todo S, Banner B, Zerbe T, Sysyn G, Starzl TE. Pathologic observations in human allograft recipients treated with FK 506. *Transplant Proc.* 1990 Feb;22(1):25-34.
59. [No authors listed] Morphopathological findings of renal allografts under FK 506 therapy. Japanese FK 506 Study Group. *Transplant Proc.* 1994 Aug;26(4):1933-6.
60. Randhawa PS, Tsamandas AC, Magnone M, Jordan M, Shapiro R, Starzl TE, Demetris AJ. Microvascular changes in renal allografts associated with FK506 (Tacrolimus) therapy. *Am J Surg Pathol.* 1996 Mar;20(3):306-12.
61. Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. Morphologic diagnosis of cyclosporine nephrotoxicity. *Semin Diagn Pathol.* 1988 Feb;5(1):104-21.
62. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *Kidney Int Suppl.* 1995 Dec;52:S63-9.

63. Dr. Beyza Macunluoğlu. Kronik siklosporin A nefrotoksitesisi geliştirilmiş hayvan modelinde spironolaktone tedavisinin etkisi. 2004
64. Dr. Melike Betül Ögütmen. Kronik Tacrolimus nefrotoksitesisi oluşturulmuş sıçan modelinde TGF- β , VEGF, BMP-7 immünekspresyonlarının patogenezdaki rolü. 2004
65. Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int.* 1996 Oct;50(4):1089-100.
66. Armstrong DL .Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca²⁺-activated phosphatase in mammalian brain. *Trends Neurosci.* 1989 Mar;12(3):117-22.
67. Demetris AJ, Banner B, Fung J, Shapiro R, Jordan M, Starzl TE.Histopathology of human renal allograft rejection under FK 506: a comparison with cyclosporine. *Transplant Proc.* 1991 Feb;23(1 Pt 2):944-6.
68. Shapiro R, Jordan M, Fung J, McCauley J, Johnston J, Iwaki Y, Tzakis A, Hakala T, Todo S, Starzl TE. Kidney transplantation under FK 506 immunosuppression. *Transplant Proc.* 1991 Feb;23(1 Pt 2):920-3.
69. Nalesnik MA, Todo S, Murase N, Gryzan S, Lee PH, Makowka L, Starzl TE. Toxicology of FK-506 in the Lewis rat. *Transplant Proc.* 1987 Oct;19(5 Suppl 6):89-92.
70. Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N.Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 1987 Jul;32(1):19-25.
71. Takeda Y, Yoneda T, Ito Y, Miyamori I, Takeda R. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in human endothelial cells by FK 506. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 8:S310-2.
72. Goodall T, Kind CN, Hammond TG.FK506-induced endothelin release by cultured rat mesangial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26 Suppl 3:S482-5.
73. Moutabarrik A, Ishibashi M, Fukunaga M, Kameoka H, Takano Y, Kokado Y, Takahara S, Jiang H, Sonoda T, Okuyama A.FK 506 mechanism of nephrotoxicity: stimulatory effect on endothelin secretion by cultured kidney cells and tubular cell toxicity in vitro. *Transplant Proc.* 1991 Dec;23(6):3133-6.
74. Campistol JM, Sacks SH. Mechanisms of nephrotoxicity. *Transplantation.* 2000 Jun 27;69(12 Suppl):SS5-10.
75. Vieira JM Jr, Noronha IL, Malheiros DM, Burdmann EA.Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF-beta expression with preserved renal blood flow. *Transplantation.* 1999 Dec 15;68(11):1746-53.

76. Yamada K, Sugisaki Y, Akimoto M, Yamanaka N. Short-term FK 506-induced morphological changes in rat kidneys. *Transplant Proc.* 1991 Dec;23(6):3130-2.
77. Andoh TF, Burdmann EA, Lindsley J, Houghton DC, Bennett WM. Enhancement of FK506 nephrotoxicity by sodium depletion in an experimental rat model. *Transplantation.* 1994 Feb 27;57(4):483-9.
78. Nielsen FT, Leyssac PP, Kemp E, Starklint H, Dieperink H. Nephrotoxicity of FK-506 in the rat. Studies on glomerular and tubular function, and on the relationship between efficacy and toxicity. *Nephrol Dial Transplant.* 1995;10(3):334-40.
79. Khanna AK, Cairns VR, Becker CG, Hosenpud JD. Transforming growth factor (TGF)-beta mimics and anti-TGF-beta antibody abrogates the in vivo effects of cyclosporine: demonstration of a direct role of TGF-beta in immunosuppression and nephrotoxicity of cyclosporine. *Transplantation.* 1999 Mar 27;67(6):882-9.
80. Shehata M, el Nahas A, Barkworth E, Cope GH, Raftery AT. Increased platelet-derived growth factor in the kidneys of cyclosporin-treated rats. *Kidney Int.* 1994 Sep;46(3):726-32.
81. Shehata M, Cope GH, Johnson TS, Raftery AT, el Nahas AM. Cyclosporine enhances the expression of TGF-beta in the juxtaglomerular cells of the rat kidney. *Kidney Int.* 1995 Nov;48(5):1487-96.
82. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int.* 1994 Mar;45(3):916-27.
83. Sharma VK, Bologna RM, Xu GP, Li B, Mouradian J, Wang J, Serur D, Rao V, Suthanthiran M. Intra-graft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int.* 1996 May;49(5):1297-303.
84. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor β in human disease. *N Engl J Med.* 2000 May 4;342(18):1350-58.
85. Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja J. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res.* 1998;75:87-134.
86. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:597-641.
87. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994 Nov 10;331(19):1286-92.
88. Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect.* 1999 Dec;1(15):1349-65.

89. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, Hase M, Takai H, Harada A, Ikeda K. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res.* 1998 Oct;13(10):1569-76.
90. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet.* 1999 Jan;8(1):93-7.
91. Li B, Khanna A, Sharma V, Singh T, Suthanthiran M, August P. TGF-beta1 DNA polymorphisms, protein levels, and blood pressure. *Hypertension.* 1999 Jan;33(1 Pt 2):271-5.
92. Claesson-Welsh L. Mechanism of action of platelet-derived growth factor. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996 Apr;28(4):373-85. Abstract
93. Matsuda M, Shikata K, Makino H, Sugimoto H, Ota K, Akiyama K, Hirata K, Ota Z. Gene expression of PDGF and PDGF receptor in various forms of glomerulonephritis. *Am J Nephrol.* 1997;17(1):25-31.
94. Seifert RA, Alpers CE, Bowen-Pope DF. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in the developing and adult mouse kidney. *Kidney Int.* 1998 Sep;54(3):731-46
95. Westermark B, Heldin CH. Platelet-derived growth factor. Structure, function and implications in normal and malignant cell growth. *Acta Oncol.* 1993;32(2):101-5.
96. Hosgood G. Wound healing. The role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Vet Surg.* 1993 Nov-Dec;22(6):490-5. Abstract
97. Betsholtz C, Raines EW. Platelet-derived growth factor: a key regulator of connective tissue cells in embryogenesis and pathogenesis. *Kidney Int.* 1997 May;51(5):1361-9.
98. Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 1994 Aug 15;8(16):1875-87.
99. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 1994 Aug 15;8(16):1888-96.
100. Gilbert RE, Kelly DJ, McKay T, Chadban S, Hill PA, Cooper ME, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. PDGF signal transduction inhibition ameliorates experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2001 Apr;59(4):1324-32.
101. Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 2000; 57: 2207-14.

102. Harland RM. The transforming growth factor beta family and induction of the vertebrate mesoderm: Bone morphogenetic proteins are vertebrate inducers. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 71: 10243-46.
103. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10: 1580-94. PMID: 12762452
104. Kim RY, Robertson EJ, Solloway MJ. Bmp6 and Bmp7 are required for cushion formation and septation in the developing mouse heart. *Dev Biol.* 2001 Jul 15;235(2):449-66.
105. Solloway MJ, Robertson EJ. Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development.* 1999 Apr;126(8):1753-68.
106. Jena N, Martin-Seisdedos C, McCue P, Croce CM. BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res.* 1997 Jan 10;230(1):28-37.
107. Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.* 1995 Nov 15;9(22):2808-20.
108. Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev.* 1995 Nov 15;9(22):2795-807.
109. Dudley AT, Robertson EJ. Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Dev Dyn.* 1997 Mar;208(3):349-62.
110. Dorai H, Shepard A, Ozkaynak E, Lin K, Jones S, Oppermann H, Sampath K. The 5' flanking region of the human bone morphogenetic protein-7 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Apr 6;282(3):823-31.
111. Wrana JL. Structural biology: On the wings of inhibition. *Nature* 2002 Dec; 420, 613-614
112. Schulunegger MP, Gruter MG. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2: A resolution of human transforming growth factor-beta 2. *Nature* 1992; 358: 430-34.
113. Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies OR. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2. An unusual fold for the super family. *Science* 1992; 257: 369-73.
114. Helder MN, Ozkaynak E, Sampath KT, Luyten FP, Latin V, Oppermann H, Vukicevic S. Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-

- 7) in human and mouse development. *J Histochem Cytochem.* 1995 Oct;43(10):1035-44.
115. Simon M, Maresh JG, Harris SE, Hernandez JD, Arar M, Olson MS, Abboud HE. Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am J Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 2):F382-9.
116. Hruska KA. Treatment of chronic tubulointerstitial disease: a new concept. *Kidney Int.* 2002 May;61(5):1911-22.
117. Bosukonda D, Shih MS, Sampath KT, Vukicevic S. Characterization of receptors for osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7 (OP-1/BMP-7) in rat kidneys. *Kidney Int.* 2000 Nov;58(5):1902-11.
118. Vukicevic S, Kopp JB, Luyten FP, Sampath TK. Induction of nephrogenic mesenchyme by osteogenic protein 1 (bone morphogenetic protein 7). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 20;93(17):9021-6.
119. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med.* 2003 Jul;9(7):964-8.
120. Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res.* 1999 Mar;17(2):269-78.
121. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature.* 1997 Oct 9;389(6651):622-6.
122. Dorai H, Vukicevic S, Sampath T. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J Cell Physiol.* 2000 Jul;184(1):37-45
123. Wang S, Hirschberg R. BMP7 antagonizes TGF-beta -dependent fibrogenesis in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 May;284(5):F1006-13.
124. Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H. BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int.* 2002 Jan;61(1):51-60.
125. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood.* 1995 Aug 15;86(4):1243-54.

126. Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J*. 2001 Jan;15(1):43-58.
127. Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*. 1993 Jun 18;260(5115):1808-10.
128. Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Horn F, Heinrich PC, Graeve L. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem*. 1996 May 31;271(22):12991-8.
129. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S233-42. Epub 2002 May 09.
130. Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(24):9035-9.
131. Suzuki C, Okano A, Takatsuki F, Miyasaka Y, Hirano T, Kishimoto T, Ejima D, Akiyama Y. Continuous perfusion with interleukin 6 (IL-6) enhances production of hematopoietic stem cells (CFU-S). *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Mar 31;159(3):933-8.
132. Okano A, Suzuki C, Takatsuki F, Akiyama Y, Koike K, Ozawa K, Hirano T, Kishimoto T, Nakahata T, Asano S. In vitro expansion of the murine pluripotent hemopoietic stem cell population in response to interleukin 3 and interleukin 6. Application to bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1989 Sep;48(3):495-8.
133. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med*. 1998 Jan 15;128(2):127-37.
134. Horii Y, Iwano M, Suematsu S, Matsusaka T, Matsuda T, Muraguchi A, Yamamoto T, Miyazaki J, Yamamura K, Dohi K, Ishikawa H, Hirano T, Kishimoto T: Interleukin-6 and mesangial proliferation: Generation and differentiation of IL-6 transgenic mice., in *Pathogenesis of IgA nephropathy*, edited by H Sakai, O Sakai, Y Nomoto, Tokyo, Harcourt Brace Javanovich Japan, 1990, pp: 127-143
135. Suematsu S, Matsuda T, Aozasa K, Akira S, Nakano N, Ohno S, Miyazaki J, Yamamura K, Hirano T, Kishimoto T. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(19):7547-51.

136. Coleman DL, Ruef C. Interleukin-6: an autocrine regulator of mesangial cell growth. *Kidney Int.* 1992 Mar;41(3):604-6.
137. Horii Y, Muraguchi A, Iwano M, Matsuda T, Hirayama T, Yamada H, Fujii Y, Dohi K, Ishikawa H, Ohmoto Y, et al. Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol.* 1989 Dec 15;143(12):3949-55.
138. Moriyama T, Fujibayashi M, Fujiwara Y, Kaneko T, Xia C, Imai E, Kamada T, Ando A, Ueda N. Angiotensin II stimulates interleukin-6 release from cultured mouse mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1995 Jul;6(1):95-101.
139. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res.* 1999 Apr 2;84(6):695-703.
140. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Zeeuw D. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int.* 2004 Jun;65(6):2003-17.
141. Alvarez Arroyo MV, Caramelo C, Angeles Castilla M, Gonzalez Pacheco FR, Martin O, Arias J. Role of vascular endothelial growth factor in the response to vessel injury. *Kidney Int Suppl.* 1998 Dec;68:S7-9.
142. Tilton RG, Chang KC, LeJeune WS, Stephan CC, Brock TA, Williamson JR. Role for nitric oxide in the hyperpermeability and hemodynamic changes induced by intravenous VEGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Mar;40(3):689-96.
143. Kang DH, Johnson RJ. Vascular endothelial growth factor: a new player in the pathogenesis of renal fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003 Jan;12(1):43-9.
144. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999 Jan;13(1):9-22.
145. Khamaisi M, Schrijvers BF, De Zeeuw D, Raz I, Flyvbjerg A. The emerging role of VEGF in diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Aug;18(8):1427-30.
146. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond).* 2001 May;100(5):481-92.
147. Crisan D, Carr J. Angiotensin I-converting enzyme: genotype and disease associations. *J Mol Diagn.* 2000 Aug;2(3):105-15.
148. Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. Drug Therapy: Angiotensin receptors and their antagonists. *The New England Journal of Medicine* 1996; Volüm 334, no: 25: 1649-1654
149. Hackenthal E, Metz R, Buhle CP, Taugner R. Intrarenal and intracellular distribution of renin and angiotensin. *Kidney Int Suppl.* 1987 May;20:S4-17.

150. Cheung BM. Blockade of the renin-angiotensin system. *Hong Kong Med J*. 2002 Jun;8(3):185-91.
151. Johnston CI. Franz Volhard Lecture. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *J Hypertens Suppl*. 1992 Dec;10(7):S13-26.
152. Schiffrin EL. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med*. 2002 Oct 1;113(5):409-18.
153. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*. 2001 Sep;38(3 Pt 2):635-8.
154. Morrison AR: Hypertension. *The Washington Manual of Medical Therapeutics* 2001, edited by Aha SN, Flood K, Paranjothi S, USA. Lippincott Company 30 th edition ,pp: 86-87
155. Angiotensin II receptor blockers. *Current Medical Diagnosis&Treatment* 2003, edited by Tierney LM, McPhee SJ, Ppadakias MA, USA. McGraw-Hill Companies 42nd edition, pp: 427
156. Islam M, Burke JF Jr, McGowan TA, Zhu Y, Dunn SR, McCue P, Kanalas J, Sharma K. Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int*. 2001 Feb;59(2):498-506.
157. Shihab FS, Bennett WM, Isaac J, Yi H, Andoh TF. Angiotensin II regulation of vascular endothelial growth factor and receptors Flt-1 and KDR/Flk-1 in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*. 2002 Aug;62(2):422-33.
158. Burdmann EA, Andoh TF, Rosen S, Lindsley J, Munar MY, Elzinga LW, Bennett WM. Experimental nephrotoxicity, hepatotoxicity and pharmacokinetics of cyclosporin G versus cyclosporin A. *Kidney Int*. 1994 Mar;45(3):684-91.
159. Stillman IE, Andoh TF, Burdmann EA, Bennett WM, Rosen S. FK506 nephrotoxicity: morphologic and physiologic characterization of a rat model. *Lab Invest*. 1995 Dec;73(6):794-803.
160. Ohashi R, Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Peritubular capillary regression during the progression of experimental obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Jul;13(7):1795-805.
161. Shimizu T, Tanabe K, Tokumoto T, Ishikawa N, Shimmura H, Oshima T, Toma H, Yamaguchi Y. Risk factors of acute Tacrolimus nephrotoxicity in renal allografts. *Transplant Proc*. 2000 Nov;32(7):1914-6.
162. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated

- from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)*. 1987 Sep;40(9):1256-65.
163. Sawada S, Suzuki G, Kawase Y, Takaku F. Novel immunosuppressive agent, FK506. In vitro effects on the cloned T cell activation. *J Immunol*. 1987 Sep 15;139(6):1797-803.
164. Mochizuki M, Kawashima H. Effects of FK506, 15-deoxyspergualin, and cyclosporine on experimental autoimmune uveoretinitis in the rat. *Autoimmunity*. 1990;8(1):37-41.
165. Vercauteren SB, Bosmans JL, Elseviers MM, Verpooten GA, De Broe ME. A meta-analysis and morphological review of cyclosporine-induced nephrotoxicity in auto-immune diseases. *Kidney Int*. 1998 Aug;54(2):536-45.
166. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, Arndorfer J, Christensen L, Merion RM. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003 Sep 4;349(10):931-40.
167. Holmer S, Eckardt KU, LeHir M, Schricker K, Riegger G, Kurtz A. Influence of dietary NaCl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Pflugers Arch*. 1993 Oct;425(1-2):62-7.
168. Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II as a hypertrophogenic cytokine for proximal tubular cells. *Kidney Int Suppl*. 1993 Jan;39:S100-7.
169. Gardiner DS, Watson MA, Junor BJ, Briggs JD, More IA, Lindop GB. The effect of conversion from cyclosporin to azathioprine on renin-containing cells in renal allograft biopsies. *Nephrol Dial Transplant*. 1991;6(5):363-7.
170. Tufro-McReddie A, Gomez RA, Norling LL, Omar AA, Moore LC, Kaskel FJ. Effect of CsA on the expression of renin and angiotensin type 1 receptor genes in the rat kidney. *Kidney Int*. 1993 Mar;43(3):615-22.
171. Burdmann EA, Andoh TF, Nast CC, Evan A, Connors BA, Coffman TM, Lindsley J. Prevention of experimental cyclosporin-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. Bennett WM. *Am J Physiol*. 1995 Oct;269(4 Pt 2):F491-9.
172. Andersson J, Nagy S, Groth CG, Andersson U. Effects of FK506 and cyclosporin A on cytokine production studied in vitro at a single-cell level. *Immunology*. 1992 Jan;75(1):136-42.
173. Rostaing L, Tran-Van T, Cisterne JM, Tack I, Durand D, Ader JL. Influence of early FK 506 trough levels on glomerular hemodynamics at 3 months in kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 1998 Jun;30(4):1282-4.

174. Morrissey J, Hruska K, Guo G, Wang S, Chen Q, Klahr S. Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function. *Am Soc Nephrol*. 2002 Jan;13 Suppl 1:S14-21.
175. Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke ML, Beirowski B, Addicks K, Bloch W, Smyth N, Weber M. Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Jul;19(7):1716-23. Epub 2004 May 05.
176. Khachigian LM, Takuwa Y, Collins T. Mechanisms of angiotensin II-induced platelet-derived growth factor gene expression. *Mol Cell Biochem*. 2000 Sep;212(1-2):183-6.
177. Vukicevic S, Basic V, Rogic D, Basic N, Shih MS, Shepard A, Jin D, Dattatreya Murthy B, Jones W, Dorai H, Ryan S, Griffiths D, Maliakal J, Jelic M, Pastorcic M, Stavljenic A, Sampath TK. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest*. 1998 Jul 1;102(1):202-14.
178. Tuğlular S, Gogas Yavuz D, Çakalağaoğlu F, Çitak L, Arıkan H, Koçak H, Özener Ç, Akoğlu E. Cyclosporine-A induced nephrotoxicity is associated with decreased renal bone morphogenetic protein-7 expression in rats. *Transplant Proc*. 2004;36(1):131-3
179. Blantz RC, Konnen KS, Tucker BJ. Angiotensin II effects upon the glomerular microcirculation and ultrafiltration coefficient of the rat. *J Clin Invest*. 1976 Feb;57(2):419-34.
180. Miller PL, Rennke HG, Meyer TW. Glomerular hypertrophy accelerates hypertensive glomerular injury in rats. *Am J Physiol*. 1991 Sep;261(3 Pt 2):F459-65.
181. Taal MW, Brenner BM. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int*. . 2000; 57: 1803–1817.
182. Navis G, De Jong PE, De Zeeuw D. Specific pharmacologic approaches to clinical renoprotection. In: Brenner BM, Rector FC, eds. *Brenner's and Rector's The Kidney*. New York: WB Saunders; 2000: 2341–2372.
183. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension*. . 1992; 19: 464–474.
184. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue

- myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* . 1993; 122: 103–111.
185. Tang WW, Ulich TR, Lacey DL, Hill DC, Qi M, Kaufman SA, Van GY, Tarpley JE, Yee JS. Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol.* . 1996; 148: 1169–1180.
186. Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. The inflammatory component in progressive renal disease are interventions possible? *Nephrol Dial Transplant.* 2002 Mar;17(3):363-8.
187. Lafayette RA, Mayer G, Park SK, Meyer TW. Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest.* 1992 Sep;90(3):766-71.
188. Klahr S, Morrissey JJ. Comparative effect of ACE inhibition and angiotensin II receptor blockade in the prevention of renal damage. *Kidney Int* 2002 Apr;75:S23-26.

8-EK TEŞEKKÜR

Tacrolimusun hayvan kullanımı için özel ampüllerinin (Fujisawa) temin edilmesindeki katkılarından dolayı *Eczacıbaşı A.Ş*'e, biyokimyasal örneklerin laboratuvar çalışmalarını finanse eden *Novartis A.Ş*'e teşekkür ederim.

