

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

OBSTRÜKTİF NEFROPATİDE SİMVASTATİN VE
ERİTROPOETİNİN RENAL FİBROZİS ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
Dr.Yonca AÇIKGÖZ

SAMSUN/2009

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

**OBSTRÜKTİF NEFROPATİDE SİMVASTATİN VE
ERİTROPOETİNİN RENAL FİBROZİS ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr.Yonca AÇIKGÖZ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. Kenan BEK**

SAMSUN/2009

TEŞEKKÜR

Pediyatri Nefroloji Departmanında yan dal uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yetişmemde büyük emekleri olan saygıdeğer hocalarım Doç.Dr.Ozan ÖZKAYA'ya, Doç.Dr.Kenan BEK'e, kısa süreli de olsa bilgi ve deneyimlerinden faydalanma şansı bulduğum saygıdeğer hocam Prof.Dr.Şükrü ARSLAN'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Kemal BAYSAL başta olmak üzere diğer bütün değerli hocalarıma, yan dal asistanlığını beraber yaptığım Dr.Gürkan GENÇ ve Dr.Hülya NALÇACIOĞLU ile birlikte bütün pediyatri asistanı arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın çok yoğun olan patoloji çalışmasında değerli katkılarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Bilge CAN'a ve tüm patoloji teknisyenlerine, tez çalışmamın cerrahi işlemini gerçekleştiren ayrıca tüm uzmanlık eğitimim süresince beni destekleyen sevgili eşim Gazi Devlet Hastanesi Üroloji Bölümü'nden Uz.Dr.Abdullah AÇIKGÖZ'e ve tüm cerrahi araştırma teknisyenlerine,

Pediyatri Nefroloji Departmanı'nda birlikte çalıştığımız periton diyalizi hemşiresi Arzu SARIÇAM ve sekreterimiz Egemen ÖZMEN'e başta olmak üzere pediyatri kliniğinde çalışan tüm hemşire ve personele,

Yan dal uzmanlık eğitimim de bilgi ve deneyimlerinden faydalanma fırsatı veren Prof.Dr.Ayşin BAKKALOĞLU başta olmak üzere Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediyatri Nefroloji-Romatoloji Bilim Dalında bulunan bütün hocalarıma,

Yan dal uzmanlık eğitimim süresince her ihtiyacım olduğunda yanımda olabilen aileme ve varlığı ile bana mutlulukların en büyüğünü veren oğlum Volkan AÇIKGÖZ'e sonsuz teşekkür ederim.

Uz.Dr.Yonca AÇIKGÖZ

Aralık 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	IV
KISALTMALAR.....	VI
TABLolar.....	XIII
ŞEKİLLER.....	IX
RESİMLER.....	X
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
4.BULGULAR.....	32
5.TARTIŞMA.....	42
6.SONUÇLAR.....	47
7.KAYNAKLAR.....	49

ÖZET

Obstrüktif nefropati (ON) ülkemizde, çocuk ve infantlarda en önemli kronik böbrek hastalığı (KBH) nedenlerinden biridir. Progresif interstisiyel fibrozis gelişmesi tüm KBH'ları formlarında olduğu gibi kronik ON'nin en dramatik sonucudur. Bu nedenle ON tedavisinde fibrozis gelişmesinin önlenmesi çok önemli bir tedavi seçeneğidir. Statin grubu ilaçlardan Simvastatin (Simv) ve Eritropoetin (Epo) çeşitli dokularda antiinflamatuvar ve antifibrotik etkileri deneysel çalışmalarla araştırılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, TÜO oluşturulmuş ratlarda Simv ve Epo'nin *nuclear factor kappa B* (NFkB), *transforming growth factor-β* (TGF-β), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *platelet-derived growth factor B* (PDGF B), fibronektin ekspresyonu ve interstisiyel fibrozis gelişmesi üzerine etkilerinin ortaya konması ve karşılaştırılmasıdır.

Çalışmamızda 48 adet 200-250gr ağırlığında Sprague Dawley cinsi rat kullanıldı. Her grupta 12 rat olacak şekilde sham grubu, Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu oluşturuldu. Sham grubu dışındaki ratların üreterleri bağlanarak tek taraflı obstrüksiyon oluşturuldu. Kontrol grubuna %1'lik karboksimetilsellüloz, Epo grubuna epoetin alfa ve Simv grubuna %1'lik karboksimetilsellüloz solüsyonu içinde çözünmüş simvastatin 14 gün süresince verildi. Ondördüncü günün sonunda tüm grupların sol böbrekleri çıkarıldı. Tüm gruplar; intersitisiyel fibrozisi göstermek için Masson trikrom ile boyandı, TGF-β, PDGF B, bFGF, NFkB ve fibronektin ekspresyonunu göstermek için immunohistokimyasal yöntem ile boyandı.

Morfolojik incelemede sham grubunda tübül yapılarının ve tübülointerstisiyel alanın normal olduğu; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubunda ise proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon, tübüler atrofi ve tübülointerstisiyel alanda fibröz genişleme olduğu, glomerül yapılarının ise korunduğu görüldü. Sham grubunda TGF-β, NFkB, PDGF B, bFGF, fibronektin ekspresyonu ve Masson trikrom ile boyanma Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu. Eritropoetin grubu ve Simv grubunda TGF-β, fibronektin ekspresyonu ve Masson trikrom ile boyanma kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. Ayrıca fibronektin ekspresyonu Epo grubunda Simv grubuna göre de daha düşük bulundu. Simvastatin grubundan farklı olarak Epo grubunda NFkB ve bFGF ekspresyonu da kontrol grubuna göre daha düşük bulundu.

Sonuç olarak Epo ve Simv'in ON'de fibrozisi önlediği ve Epo'nin profibrotik faktörlerden NFkB ve bFGF ekspresyonunu Simv'e göre daha etkili baskılayarak fibrozisi

daha fazla önlediği görüldü. Buna göre ON'de fibrozisi önlemek için EPO'nin Simv'den daha uygun bir ajan olabileceği düşünöldü. Bu çalışma Simv ve Epo'nin ON'de antifibrotik etkinliğinin karşılaştırıldığı ilk çalışmadır. Bu sonucun diğer deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

ABSTRACT

Obstructive nephropathy (ON) is one of the most important causes of chronic kidney disease in infants and children in our country. Progressive interstitial fibrosis, as in all forms of chronic kidney diseases, is the most dramatic result of ON as well. Therefore prevention of development of fibrosis is a very important therapeutic strategy in ON treatment. Anti-inflammatory and anti-fibrotic actions of various mediators such as Simvastatin (Simv), a statin group drug, and Erythropoietin (Epo) have been investigated in various studies. The aim of this study to show and compare the actions of Simv and Epo in NFkB, TGF β , bFGF, PDGF B, fibronectin expression and development of interstitial fibrosis in rats with experimentally induced unilateral ureteral obstruction.

In our study 48 Sprague Dawley rats, weighing 200-250 gr on average, were used. Four groups each having 12 rats were constituted as sham, Epo, simv and control. Unilateral ureteral obstruction was induced by ureteral ligation in all rats except Sham group. Other than sham group, 1% carboxymethyl cellulose to controls, intramuscular epoietin alfa to Epo group and oral simvastatin dissolved in 1% carboxymethyl cellulose solution to simvastatin group were given for 14 days. At the end of 14 days rats in all groups were undergone bilateral nephrectomy. For interstitial fibrosis Masson trichrom dye and for the expression of TGF- β , PDGF B, bFGF, NFkB and fibronectin immunohistochemical methods were used in all groups.

In microscopic examination renal tubules and tubulointerstitium were normal in Sham group. In Epo and Simv groups however, tubular atrophy and fibrous expansion of tubulointerstitium were seen with glomerular structures spared. In Sham group expression of TGF β , NFkB, PDGF B, bFGF, fibronectin and staining with Masson trichrom were significantly less compared to Epo, Simv and control groups. In Epo and Simv groups expression of TGF- β and fibronectin and staining with Masson trichrom were less compared to control group. In addition, fibronectin expression in Epo group was less than Simv group. Different than the Simv group, Nfkb and bFGF expression in Epo group were less when compared to control group.

As a result it was seen that Epo and Simv prevented fibrosis in ON. Epo was superior in this effect by suppressing the expressions of profibrotic factors NFkB and bFGF more effectively than Simv. Based on this finding it was thought that Epo might be a better agent than Simv in the prevention of fibrosis in ON. This is the first study comparing

the actions of Epo and Simv on fibrosis in ON. Further experimental and clinical studies should support our results.

KISALTMALAR

ON	: Obstrüktif nefropati
KBH	: Kronik böbrek Hastalığı
TÜO	: Tek taraflı üreter obstrüksiyonu
GFH	: Glomerüler filtrasyon hızı
Simv	: Simvastatin
Epo	: Eritropoetin
NFkB	: Nuclear factor kappa B
TGF-β	: Transforming growth factor-β
bFGF	: Basic fibroblast growth factor
PDGF	: Platelet-derived growth factor
EGF	: Epidermal growth faktör
α-SMA	: α-smooth muscle actin
MCP-1	: Monocyte chemoattractant protein-1
ICAM-1	: Intercellular-adhesion molecule 1
Mac-1	: Macrophage antigen-1
LFA-1	: Leukocyte function-associated antigen-1
IL 1	: Interleukin 1
ARB	: Anjiyotensin reseptör blokörü
CCR1	: Chemokine receptor 1
CR2	: Chemokine receptor 2
CSF-1	: Colony stimulating factor-1
CST	: Cerebroside sulfotransferase
HO-1	: Heme oxygenase-1
PAI-1	: Plasminogen activator inhibitor-1
iNOS	: Inducible nitric oxide synthase
uPAR	: Urokinase receptor
ROCK	: Rho-associated coiled –coil forming proteinkinase
DAPK	: Death associate protein kinase
BMP-7	: Bone morphogenetic protein-7
p38 MAPK	: p38 mitogen-activated protein kinase

KISALTMALAR (Devamı)

TNF- α	: Tumor-necrosis factor- α
IGF-1	: Insulin-like growth factor-1
HB-EGF	: Heparin binding EGF growth factor
HGF	: Hepatocyte growth factor
EMT	: Epitelial mezankimal transformasyon
CTGF	: Connective-tissue growth factor
tPA	: Tissue-type plasminogen activator
ACEI	: Angiotensin-converting-enzyme inhibitor
B2	: Bradykinin 2
KCP	: Kielin/chordin-like protein
SnoN	: Ski-related novel protein N
HMG-CoA	: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A
JAK/STAT	: Janus kinase /signal transducers and activators of transcription
EPO-R	: Eritroid prekürsör hücrelerin yüzey reptörleri
rhEPO	: Recombinant human EPO

TABLolar

Tablo I: Üriner Obstrüksiyon Sınıflandırmaları

Tablo II: Obstrüksitif nefropatide tedavi stratejilerinin fibrozis üzerine etkileri

Tablo III: İmmunohistokimyasal çalışmada kullanılan primer antikorlar

Tablo IV: TGF β , NFkB, PDGF B, b FGF kombine skor ortalama (\pm SD) değerlerinin ve fibronektin, masson trikrom için % alan ortalama (\pm SD)değerlerinin karşılaştırılması.

ŞEKİLLER

Şekil 1. Üriner obstrüksiyone neden olan faktörler

Şekil 2. Renal interstisiyel inflamasyonun patogenezi

Şekil 3. Obstrüktif nefropatide renal tübüler apopitozis patogenezi

Şekil 4. Obstrüktif Nefropatide Fibroblast Proliferasyonu

Şekil 5. Obstrüktif nefropatide interstisiyel fibrozis patogenezi

Şekil 6. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin TGF β ekspresyonu üzerine olan etkileri

Şekil 7. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin NFkB ekspresyonu üzerine olan etkileri

Şekil 8. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin PDGF B ekspresyonu üzerine olan etkileri

Şekil 9. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin bFGF ekspresyonu üzerine olan etkileri

Şekil 10. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin fibronektin ekspresyonu üzerine olan etkileri

Şekil 11. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin interstisiyel fibrozisi gösteren Masson trikrom boyalı alan üzerine olan etkileri

RESİMLER

Resim 1: Karın ön cildinin hazırlanması

Resim 2: Karın ön duvarı kesisi

Resim 3: Sol böbrek

Resim 4: Sol üreteropelvik(U-P) Bileşke

Resim 5: Obstrüksiyon uygulanmış sol üreter

Resim 6: Eritropoetin intraperitoneal verilmesi

Resim 7: Simvastatin gavaj ile oral verilmesi

Resim 8: Hidronefroz olmuş sol böbrek normal sağ böbrek

Resim 9: Hidronefrotik sol böbrek çıkarılması

Resim 10: Hidronefroz oluşmuş sol böbrek normal sağ böbrek

Resim11: Serum fizyolojik içeren kap

Resim 12: Formaldehit içinde hidronefrotik sol böbrek

Resim 13: Formaldehit ile tespit edilmiş böbrek

Resim 14: Formaldehit ile tespit edilmiş böbrek

Resim 15: Obstrüktif nefropatide TGF β , NFkB, PDGF B, bFGF ve Fibronektinin immunohistokimyasal yöntem ile boyanmasının ve kollajen birikimi için Masson trikrom boyanmasının görüntüleri. A-D: TGF β grup sham'de hafif yoğunlukta boyanma, grup kontrolde en fazla olmak üzere diğer gruplarda tübül epiteli sitoplazmasında boyanma. E-H: NFkB grup sham'de hafif yoğunlukta boyanma, grup kontrolde en fazla olmak üzere diğer gruplarda tübül epiteli sitoplazmasında ve yoğun boyanmalarda nükleusta boyanma. I-L: PDGF B grup sham'de hafif yoğunlukta boyanma, grup kontrolde en fazla olmak üzere diğer gruplarda tübül epiteli sitoplazmasında boyanma. M-P: bFGF grup sham'de hafif yoğunlukta boyanma, grup kontrolde en fazla olmak üzere diğer gruplarda tübül epiteli sitoplazmasında boyanma. R-T: Fibronektin grup sham'de hafif yoğunlukta boyanma, grup kontrolde en fazla olmak üzere diğer gruplarda tübül epiteli sitoplazmasında ve interstisyel alanda boyanma. U-Z: Masson trikrom grup sham'de boyanma yok, grup Epo ve Grup Simv'de interstisyel alanda mavi boyalı fibrozis alanları, grup kontrolde bu alanlarda belirgin artma.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Obstrüktif nefropati (ON) ülkemizde, çocuk ve infantlarda en önemli kronik böbrek hastalığı (KBH) nedenlerinden biridir (1, 2). Obstrüktif nefropatide cerrahi düzeltme endikasyonları kesinleşmemiştir ve tedavi sonrası uzun dönem takip sonuçları bilinmemektedir (3). Yapılan deneysel çalışmalarda tek taraflı üreter obstrüksiyonu (TÜO) uygulanmış ratlarda obstrüksiyon düzeltildikten 28 gün sonra aynı taraf böbrekte glomerüler filtrasyon hızının (GFH) normale döndüğü ancak interstisiyel fibrozis gelişmesinin devam ettiği görülmüştür (3, 4). Obstrüksiyon düzeltildikten 1 yıl sonraki takiplerinde ise GFH'nin azaldığı, proteinürinin arttığı ve TÜO uygulanan taraf yanı sıra sağlam olan karşı taraf böbrekte de gomerülosklerozun, tübüler atrofinin, makrofaj infiltrasyonunun ve interstisiyel fibrozisin belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (3). Bu nedenle ON tedavisinde cerrahi düzeltmenin uzun dönemde böbrek hasarlanması ve KRY gelişmesini önlemede tek başına yeterli olmadığı görülmüştür. Bu nedenle ON'de fibrozisi önleyen tedavilerin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir.

Progresif interstisiyel fibrozis gelişmesi tüm KBH'ları formlarında olduğu gibi kronik ON'nin en dramatik sonucudur. Aynı zamanda fibrozis gelişmesi diğer dokuların farklı patofizyolojik mekanizmalarla olan kronik hastalıklarının da temel sonucudur (5). Bu nedenle fibrozis gelişmesinin önlenmesi çok önemli bir tedavi stratejisidir. Ancak halen fibrozis gelişmesini engelleyen etkili bir tedavi yoktur(5). Fibrozis gelişmesi birçok hücre tipinin ve mediyatörlerin içinde bulunduğu oldukça karmaşık bir süreçtir (6, 7). Fibrozis patofizyolojisini aydınlatmak için ve fibrozis gelişmesini engellemeye yönelik tedavi stratejilerinin denendiği çalışmalar devam etmektedir. Statin grubu ilaçlardan simvastatinin (Simv) ve eritroid prekürsör hücrelerin diferansiyasyonunu ve proliferasyonunu regüle eden hamatopoetik bir faktör olan eritropoetinin (Epo) çeşitli dokularda antiinflamatuvar ve antifibrotik etkinlikleri deneysel çalışmalarla araştırılmaktadır (8-18).

Simvastatinin bir çalışmada ON'de *transforming growth factor-β* (TGF-β) düzeyini azaltarak interstisiyel inflamasyon ve fibrozisi önlediği gösterilmiştir (11). Eritropoetinin de ON'de TGF-β düzeyini azaltarak ve *Bcl-2* düzeyini artırarak inflamasyonu, fibrozisi ve apoptozisi önlediği gösterilmiştir (12-14). Eritropoetinin NFκB aktivasyonunu önlediği myokard dokusunda iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında, travmatik beyin hasarlanmasında ve peritoneal fibroziste

gösterilmiştir (18-20). Eritropoetinin NFkB, *basic fibroblast growth factor* (bFGF) ve *platelet-derived growth factor B* (PDGF B) üzerine etkisi ON'de çalışılmamıştır. Simvastatinin ise ON'de bFGF düzeyini değiştirmediği gösterilmiş, NFkB ve PDGF B üzerine olan etkisi ise çalışılmamıştır (8).

Bu çalışmada, TÜO oluşturulmuş ratlarda Simv ve Epo'nin profibrotik faktörlerden NFkB, TGF- β , bFGF, PDGF B ve fibronektin ekspresyonu ve fibrozis gelişmesi üzerine olan etkilerinin ortaya konması ve karşılaştırılması planlanmıştır.

2-GENEL BİLGİLER

Obstrüktif üropati normal idrar akımının engellenmesi ile ortaya çıkan yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin tümünü kapsayan bir tanımlamadır (21). Obstrüktif nefropati üriner obstrüksiyona bağlı böbrekte meydana gelen yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri tanımlar. Obstrüktif üropati toplumda sık görülür ve tüm yaş gruplarında olabilir. Hidronefroz insidansı 32360 otopsi serisinde %3.8 bulunmuştur (22). Çocuklarda ise 16100 hastalık bir otopsi serisinde hidronefroz insidansı %2 bulunmuştur (23). Bu hastaların %80'i 1 yaş altındadır. Obstrüksiyon, üriner sistemde üretral meadan böbrek tübülüslerine kadar uzanan geniş bir alanın herhangi bir yerinde oluşabilir. Kronik üriner yol obstrüksiyonu böbrek hasarına ve hatta böbrek yetmezliğine neden olabilir. Erişkinlerde KBH'larını en sık nedenleri diyabet ve hipertansiyon olmasına karşın çocuk ve infantlarda en sık neden böbrek gelişim bozuklukları ve ON'dir (1). *North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study* (NAPRTCS)'nin 2001 yıllık raporunda 4666 KBH'lı hastada etiyolojide %23 oranında ON'nin yer aldığı gösterilmiştir(1). Türkiye'de yapılan çok merkezli bir çalışmada ise 282 hastalık seride ON'nin %10.7 oranında KBH etiyolojisinde rol oynadığı ve erkeklerde kızlardan daha fazla olduğu gösterilmiştir (2).

Obstrüksiyonun seviyesi, süresi, nedeni, enfeksiyon varlığı ve beraberinde bulunabilen ek patolojiler obstrüksiyonun şiddetini ve gelişen klinik tabloyu oldukça etkiler. Obstrüksiyona bağlı gelişen hidronefrozla ilgili ilk sistematik bilimsel araştırmalar 1900'lü yılların başında Frank Hinman tarafından başlatılmıştır. 1919'da yapılan hayvan deneylerinde TÜO'nun birinci haftada böbrekte patofizyolojik değişikliklere yol açtığı ve 60 gün sonunda obstrüksiyon kalktığında bile kısmi histolojik düzelmeye olabileceği gösterilmiştir. 1970'li yıllarda çalışmalar daha yoğun olarak obstrüksiyonun böbrekte yol açtığı fonksiyonel ve hemodinamik bozukluklar üzerine yoğunlaşmışken son yıllarda ilgi alanı hücresel ve moleküler düzeydeki değişikliklere yönelmektedir (21).

2.1. Üriner Obstrüksiyonun Sınıflandırılması:

Üriner obstrüksiyonlar oldukça karmaşıktır ve anlaşılabilmesi için değişik sınıflamalar kullanılır (Tablo I) (21, 24).

Tablo I. Üriner Obstrüksiyon Sınıflandırmaları

Nedene göre	Konjenital	Edinsel
Süreye göre	Akut	Kronik
Derecesine göre	Komplet	İnkomplet
Seviyesine göre	İnfravezikal	Supravezikal
Etkilenime göre	Unilateral	Bilateral
Etkinin oluşuna göre	Extrensek -intraluminal -intramural	İntrensek

A-Konjenital Üriner Obstrüksiyon:

1- Üretrada:

- a. Fimozis (Erkek çocuğunda)
- b. Parafimozis (Erkek çocuğunda)
- c. Meatus eksternus darlığı (Erkek çocuğunda)
- d. Posterior üretral valv (Erkek çocuğunda)
- e. Distal üretral stenoz (Kız çocuğunda)

2- Mesane Boynu ve Mesanede:

- a. Mesane boynu darlığı
- b. Verumontanum hipertrofisi
- c. Mesane divertikülü (Üreter orifisi veya üretere bası yaparak)
- d. Spina bifida ve meningo-myelosele bağlı nörojenik mesane disfonksiyonları
- e. Trigonal ve üretral me a yetersizliği (vezikoüreteral reflü)

3- Üreterlerde

- a. Üreteral valv
- b. Üreterosel
- c. Komplet üreteral duplikasyon
- d. Üretero-vezikal bileşkede darlıklar

- e. Obstrüktif megaüreter (adinamik üreter alt ucu segmentine bağlı)
- f. Retrokaval üreter
- g. Retro-iliak üreter
- h. İdiopatik megaüreter(non-refluxing non-obstrüktif mega üreter)
- ı. Ovarian ven sendromu (vena ovarikanın üreter alt ucuna basısı)
- j. Prune Belly sendromu
- k. Üretero-pelvik darlıklar
 - Aberan damar basısı
 - Yüksek insersiyon anomalisi
 - Adinamik U-P segment
 - İntrensek üreter darlığı

4- Böbreklerde

- a. Hidrokalikozis (tek kaliks infundibulum darlığına bağlı)
- b. Megakalikozis (böbrek papillalarının malformasyonuna bağlı)
- c. Multikistik displastik böbrek
- d. Kaliksiyel divertikül
- e. Medüller sünger böbrek (kolektör tübüllerin obstrüksiyonuna bağlı)
- f. Fraley sendromu(üst kaliks boynunun arteriyel basısına bağlı)
- g. Doğmalık artıklara bağlı böbrek tümörü (Wilms tümörü)
- h. Polikistik böbrek
- ı. Renal kist

B-Edinsel Üriner Obstrüksiyon

1- Üretrada:

- a. Meatus eksternus darlığı (enfeksiyon veya enstrümantasyona bağlı)
- b. Üretra darlığı (enfeksiyon, travma ve üretra cerrahisine bağlı)
- c. Üretra taşı
- d. Periüretral apse

2- Mesane Boynu ve Mesanede:

- a. Benign prostat hipertrofisi
- b. Prostat kanseri
- c. Prostat apsesi
- d. Mesane taşı

e. Mesane tümörü

3- Üreterlerde

a. İleri evre genitoüriner maligniteler (serviks kanseri, over tümörleri, prostat kanseri, mesane tümörleri)

b. Üreter taşları

c. Retroperitoneal fibrozis

d. Retroperitoneal tümörler (lenfoma ve lenf nodu metastazları)

e. Tüberküloz ve sarkoidoz gibi inflamatuvar hastalıklar

f. Retroperitoneal hematoma ve ürinoma

g. Lenfosit

4- Böbreklerde

a. Böbrek taşları

b. Gros hematüriye bağlı kan pıhtıları

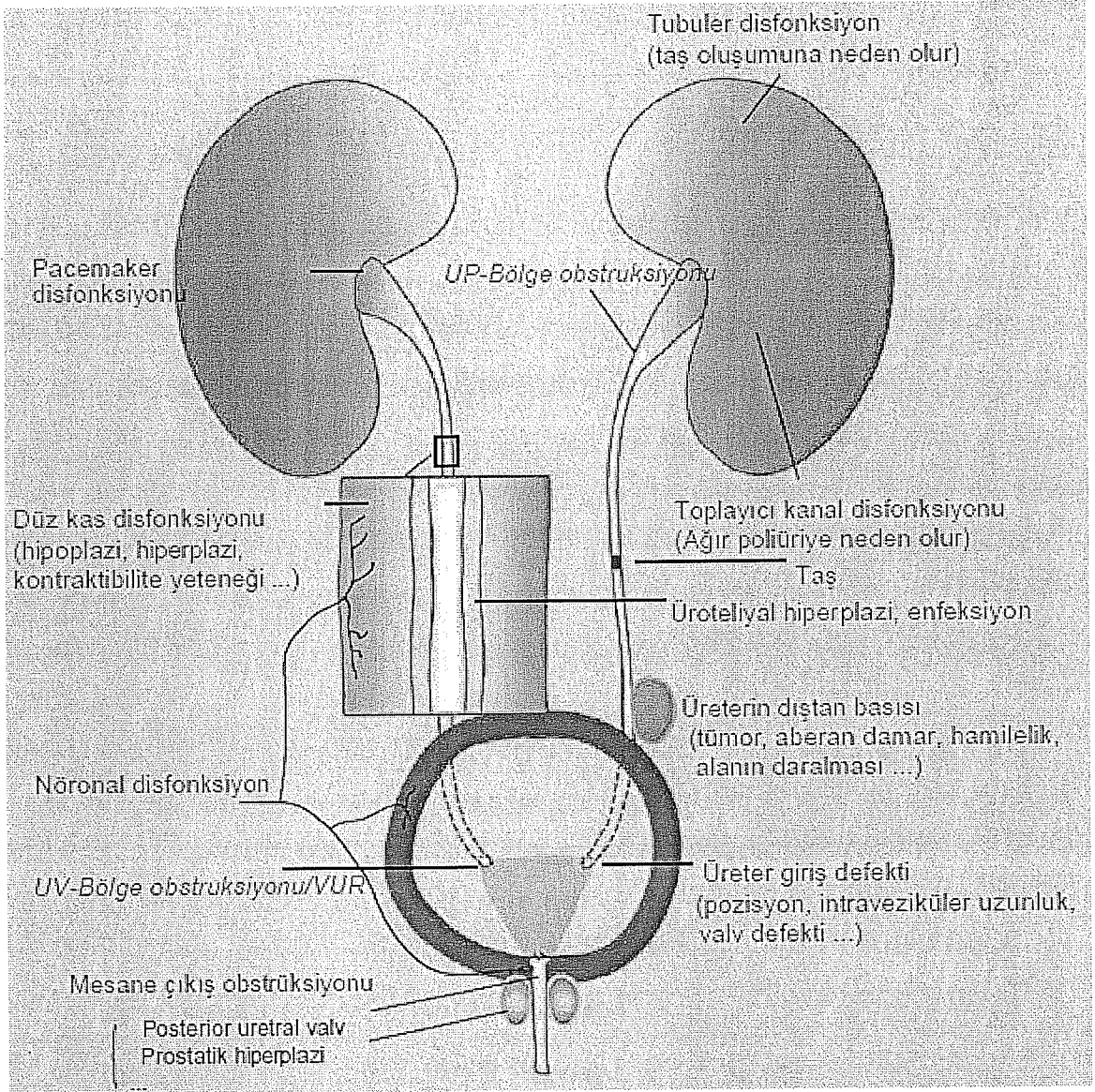
c. Renal papiller nekroz

d. Pelvis renalis tümörü

e. Tübüler disfonksiyon (taş oluşumuna neden olarak)

f. Toplayıcı kanal fonksiyon bozukluğu (poliüriye neden olarak pyeloureteral peristaltik mekanizmayı zorlar ve fonksiyonel obstrüksiyona neden olur)

Aşağıdaki şekil üreter obstrüksiyonu nedenlerini özetlemektedir (Şekil 1)(24).



Şekil 1. Üriner obstrüksiyone neden olan faktörler

2.2. Konjenital Obstrüktif Üropati

Çocuklarda en sık konjenital obstrüktif üropati görülür. Ayrıca konjenital obstrüktif üropati intrauterin dönemde büyümesi ve maturasyonu tamamlanmamış böbrekte anatomik ve hücresel değişikliklere neden olur.

Konjenital obstrüktif üropati nedenleri:

- a. Üretero-pelvik bileşke darlığı:** Konjenital hidronefroz olarak da isimlendirilir. İçten veya dıştan bası nedeni ile idrarın renal pelvisten üretere iletilmesinde bozukluk vardır. Görülme sıklığı 1500 doğumda 1'dir ve prenatal hidronefrozun en sık sebebidir (25, 26). Sol böbrekte daha sık görülür (%60),

erkeklerde kızlardan iki kat fazla görülür, genellikle tek taraflı olmakla birlikte %10-40 iki taraflı da olabilir (27,28).

- b. Üretero-vezikal bölge ostrüksiyonu:** Patoloji distal üreter ile mesanenin birleştiği bölgededir. Primer olabilir veya posterior üretral valv ve nörojen mesaneye bağlı mesane duvarında kalınlaşmanın üreter distaline dıştan bası yapmasına bağlı sekonder olabilir. Üretero-vezikal bölge ostrüksiyonu ostrüktif megaüreter olarak adlandırılır. Konjenital megaüreter %20 oranında görülür. Konjenital megaüreter ostrüksiyona ve reflüye bağlı olabilir veya ostrüksiyon ve reflü olmadan gelişebilir. Üretero-vezikal bölge ostrüksiyonu tanısı koyarken sekonder nedenlerin, reflünün ve nonostrüktif megaüreterin ayırıcı tanısının yapılması gereklidir (29).
- c. Posterior Üretral Valv:** Prostatik üretrada ostrüktif membranöz katlantı olması ile gelişir. Sadece erkek infantlarda görülür ve konjenital mesane çıkış ostrüksiyonunun en sık nedenidir. Yenidoğan hidronefrozlarının %10'nu oluşturur ve yaklaşık 5000-8000 doğumda bir görülür (30).
- d. Üreterosel:** Üreterin distal kısmının kistik dilatasyonudur. Kızlarda daha sık görülür. Kız: Erkek oranı 4:1'dir. Sıklıkla çift üreter ile birlikte görülür ve üst polün dirençinin bozulmasına neden olur.

2.3. Üriner Ostrüksiyonun Böbrek Büyümesi ve Maturasyonu Üzerine Etkileri

Üriner ostrüksiyon gelişim bozukluğuna bağlı olarak intrauterin dönemde gelişebilir. Bu durum büyümesi ve maturasyonu tamamlanmamış böbrekte hücresel hasarlanma ve anatomik değişikliklere neden olabilir. Üriner ostrüksiyonun böbrek büyümesi ve maturasyonu üzerine etkileri deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur.

Ratlarda, insanlardan farklı olarak, doğduklarında böbrekte erişkin bir rattaki miktarın sadece %10'u kadar nefron bulunur. Bu nedenle erken postnatal dönemdeki ratlar nefrogenezin hızlı olması nedeniyle üriner ostrüksiyonun böbrek büyümesi ve maturasyonu üzerine etkilerinin araştırılması için iyi bir modeldir (31). Ratlarla yapılan çalışmalarda kronik kısmi ostrüksiyonda aynı taraf böbreğin büyümesi zarar görür. Tam ostrüksiyonda yenidoğan ratlarda aynı taraf böbrekte böbrek kitlesinin ve DNA içeriğinin azaldığı, erişkin ratlarda ise DNA içeriğinin arttığı gösterilmiştir (32, 33). Kronik TÜO primitif nefronun büyümesinde rolü olan *Wnt-4*'ün renal üretiminin

uzamasına ve mezankimin epitele dönüşmesinin engellenmesine neden olur (34). Üç haftalık kısmi TÜO'nda yenidoğan ratlarda interstisiyel kollajen birikimi artar (35).

Hem insanlarda hem de hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda kısmi veya tam üriner obstrüksiyonda nefron sayısının azaldığı ve bu azalmanın miktarının obstrüksiyonun süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (36, 37, 38, 39). Ratlarda yapılan çalışmalarda nefrogenез tamamlandıktan sonra da üriner obstrüksiyonun dilate tübüllerin çevresindeki nefronlara bası yapması ile nefron sayısının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (39). Aynı zamanda insanlarda da üriner obstrüksiyonda aşırı tübüller dilatasyona bağlı nefron kaybı olduğu gösterilmiştir (40).

Kronik TÜO böbrekte renin üretiminin artmasına ve renin dağılımının fetal paterninin devam etmesine neden olur (32, 41). Renin üretiminin artması renal vasküler matürasyonun engellendiğinin göstergesidir (42).

Kronik TÜO'da glomerüler kapillerlerde sayıca artma, podositlerde düzleşme, filtrasyon alanında artma ve glomerül maturasyonunda gecikme görülür (4, 43).

Tübüllerin maturasyonu normalde böbrek gelişiminin erken evresinde üretilen *Wtn-4*, *clusterin* (glikoproteinler) ve *KS* (böbrek spesifik gen) düzeyinin azalması ile ölçülür (44). Kronik TÜO, tübüllerde *Wtn-4*, *clusterin* ve *KS* üretiminin artmasına ve normal tübül maturasyonunda düzeyi artan *epidermal growth faktör* (EGF)'ün baskılanmasına neden olur (45).

Renal interstisiyel fibroblastlar normal maturasyonda *vimentin* ve *α -smooth muscle actin* (α -SMA) üretimini kaybederler. Ancak kronik TÜO'da interstisiyel fibroblastlar tarafından *vimentin* ve α -SMA üretimi devam eder (46).

Sonuç olarak kronik TÜO'da tüm nefronun matürasyonu gecikir veya tamamen durur.

2.4. Üriner Obstrüksiyonda Patofizyoloji

Normal idrar akımı hidrostatik basınç ve üreteral peristaltizm olmak üzere iki fizyolojik olaya bağlıdır. Üreter peristaltizmi, idrar bolusunun aşağı doğru itilmesi için gereken intraluminal basıncı sağlar. Üreterde fonksiyonu sirküler ve longitudinal adele lifleri sağlar. Longitudünel lifler peristaltik hareketlerle idrarın bolus tarzında aşağıya taşınmasını sağlarken, sirküler lifler üreterde oluşan yüksek basıncın böbreğe iletilmesini engeller (21).

Üriner sistemin herhangi bir yerinde olan direnç artışı, obstrüksiyonun proksimalinde volüm ve basınç artışı ile sonuçlanır. Uzamış obstrüksiyonlarda sirküler kas liflerinin kontraksiyonu ve uyumu bozulduğundan yüksek intraluminal basınçlar böbreğe kadar iletilir. Akut komplet obstrüksiyondan sonra, obstrüksiyonun hemen üstünde ve pelvisde gittikçe artan bir genişleme olur. Üreterin proksimali ve böbrek pelvisi musküler yapısında hipertrofi ve hiperplazi meydana gelir. Daha sonra adelenin yerini kollajen ve elastik liflerin almasıyla myojenik impuls iletimi bozulur ve peristaltik aktivite azalır. Üreter adele hücreleri arasında düşük elektrik rezistansı içeren, bu nedenle de elektriksel uyarıları hücreden hücreye kolaylıkla ileten *neksus* adı verilen bağlantılar vardır. İmpulsler *neksus* vasıtasıyla aşağı doğru iletilir. Üreter distaline doğru devam eden peristaltik aktivite obstrüksiyonun olduğu yerde retrograd peristaltizme dönüşebilir. Bu durum iki hafta devam eder. Zamanla adele gergin ve iskemik bir hal alır ve atoni baş gösterir. Obstrüksiyon üreterde ise üst üreter segmenti genişler. Olay kronik ve inkomplet seyirli olduğunda üreter uzar ve kıvrımlar meydana gelerek dekompanse döneme girer. Periüreteral dokularda meydana gelen ödem ve konjesyon nedeni ile böbrek büyür. Yer yer nekroz ve infarkt alanları oluşur (21).

Tam ya da parsiyel, obstrükte olan tüm pelvislerde, kritik bir volümde kapasite aşılincaya kadar basınca karşı uyum vardır. Daha sonra pelvisin aşırı dilatasyonu genişleme sınırına ulaştığında hızlı bir basınç artışı olur. Bu aşamada iki fizyolojik olay meydana gelir.

- 1- Renal pelvis kapasitesinde artma
- 2- Aşırı dilatasyonun sınırlanması.

Bu noktada böbrek ve renal pelvisin anatomik yapısı önem kazanır. Renal pelvis yapısı küçük olan veya intrarenal pelvisli böbreklerde daha çabuk yüksek intrepelvik basınçlar oluşurken, büyük ya da ekstrarenal pelvisli böbreklerde basınç daha geç yükselir ve daha uzun süre böbrek fonksiyonu korunur (21).

Yüksek basınç ile akut obstrüksiyonun ilk birkaç günü içerisinde pelvis ve kalikslerde dilatasyon ve ardından papillalarda yassılaşma, fornikslerde yırtılma meydana gelir. Bulgular özellikle böbreğin üst ve alt polündeki papillalarda daha belirgindir. Daha sonra geri basıncın artması ile distal nefron ve kolektör kanallarda da diltasyon kendini gösterir. Obstrüksiyonun 7. gününde dilate kolektör kanallarda

başlayan nekroz ve atrofi, 28.günde medüller kalınlığının %50'sinin kaybı ve 8. haftada parankim incilmesi ile sonuçlanır (21).

2.5. Obstrüktif Nefropatide Böbrek Hasarının Değerlendirilmesi

Üriner obstrüksiyonda öncelikle renin-anjiyotensin sisteminin aktive olması ile renal vazokonstrüksiyon olur. Renin anjiyotensin sistemi aktivasyonunu takiben makrofaj infiltrasyonu, tübüler dilatasyon ve tübüler apoptozise bağlı tübüler atrofi ile karakterize interstisiyel inflamatuvar yanıt gelişir. Bu değişikliklerin sonucunda tüm kronik böbrek hastalıklarında olduğu gibi interstisiyel fibrozis gelişir.

2.5.1-Renin Anjiyotensin Sistemi:

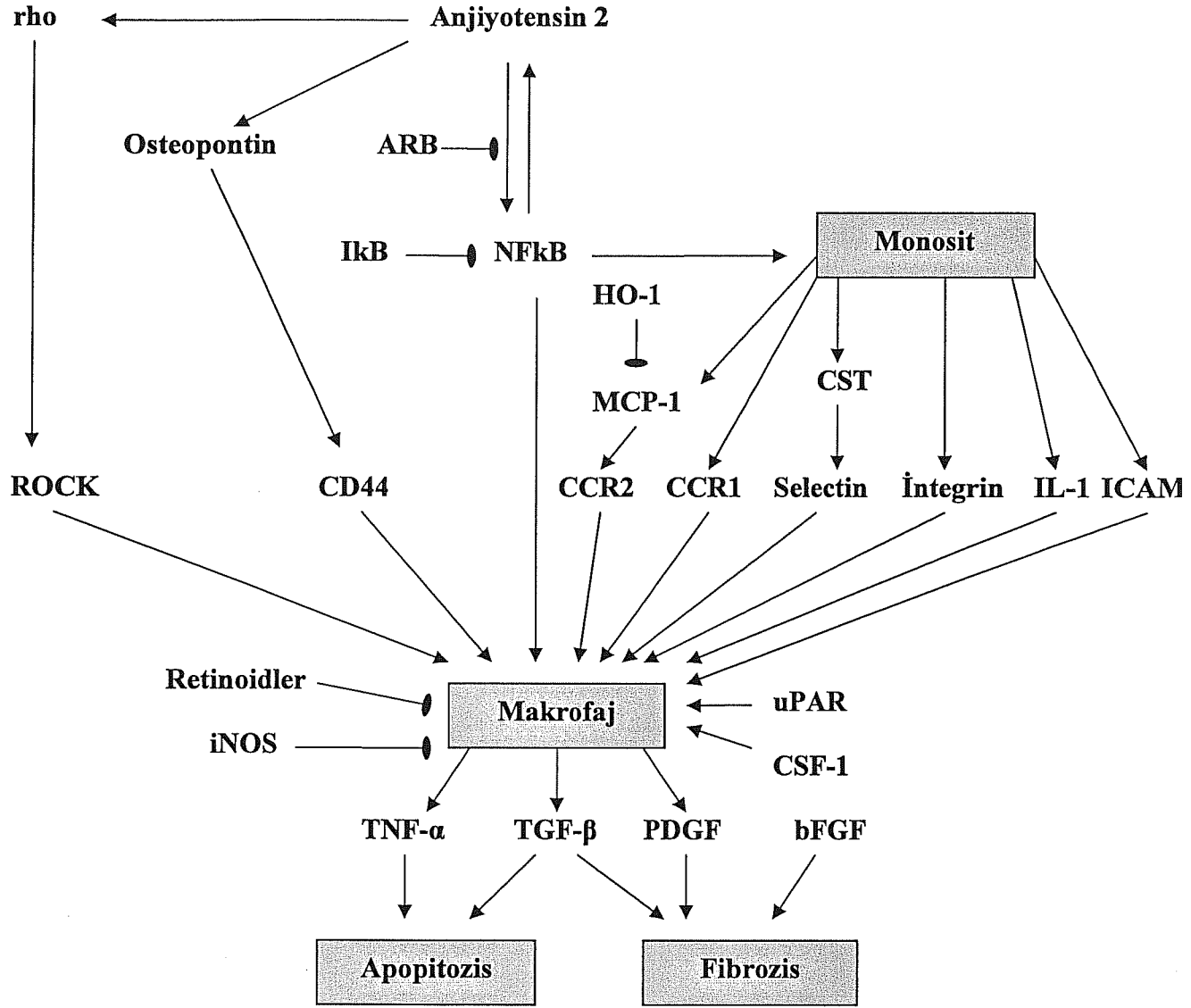
Tek taraflı üreter obstrüksiyonu oluşturulan ratlarda yapılan çalışmalarda ilk 48 saatte jukstaglomerüler aparatların %55'inde, 4. haftada %75'inde renin düzeyinin arttığı ve makrovasküler alanda depolandığı gösterilmiş (41). Renin düzeyinin artması ile anjiyotensinojenden anjiotensin 1 oluşur ve anjiyotensin dönüştürücü enzim ile anjiotensin 1 anjiotensin 2'ye dönüşür. Anjiyotensin 2 ON'nin başlamasında ve gelişmesinde hem direk hem de böbrekte hasarlanmaya yol açan moleküllerin yapımını artırarak indirek rol oynar (Şekil 2) (47). Anjiyotensin 2 aynı zamanda normal böbrek gelişimi için de gereklidir. Nefrogenез sırasında Anjiyotensin 2'nin inhibe edilmesi böbrekte gelişim bozukluklarına ve hasarlanmaya neden olur (48). Anjiyotensin 2 hücre üzerindeki reseptör tipine göre hücre büyümesini düzenler. Anjiotensin 2, AT1 reseptör üzerinden renal vasküler ve tübüler büyümeyi artırırken AT2 reseptörü aktive ederek hücre büyümesini inhibe eder (49). AT1 reseptörler afferent ve efferent arteriollerde, proksimal tübüllerde ve distal nefronun luminal yüzeyinde bulunur (49). Tek taraflı üreter obstrüksiyonunda önce AT1 ve AT2 reseptör düzeyleri azalır. Daha sonra anjiyotensin 2 düzeyi artması ile AT1 ve AT2 reseptör düzeyleri artar ve anjiyotensin 2 AT2 reseptörleri aktive ederek hücre proliferasyonunu azaltır ve apoptozisi artırır (50).

2.5.2-İntersitisiyel makrofaj infiltrasyonu:

Tek taraflı üreter obstrüksiyonu oluştuktan 4 saat sonra aynı taraf böbrek interstisyumunda lökosit infiltrasyonu olduğu ve 24 saatte maksimum düzeye çıktığı görülmüştür (51). İlerleyici tübüler atrofi ve interstisiyel fibrozis gelişmesinde, lenfosit

infiltrasyonunun önemli etkisi bulunmazken makrofajlar major rol oynar (52). Kronik TÜO'da makrofajların bölgeye toplanmasını sağlayan *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1)'in düzeyi obstrüksiyonun şiddetine paralel olarak artar. Bu proteinin infant ve çocuklarda konjenital hidronefrozun prognostik göstergesi olarak kullanılabileceği düşünülmüştür(53). Tek taraflı üreter obstrüksiyonunda mutant MCP-1 geni intramusküler verildiğinde renal fibrozisin azaldığı görülmüştür (54).

İnterstisiyel makrofaj infiltrasyonunu artıran diğer etkenler *selectin* isimli adezyon molekülleri, *intercellular-adhesion molecule 1*(ICAM-1), *macrophage antigen-1* (Mac-1), $\beta 2$ *integrin*, *leukocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) ve *interleukin 1* (IL 1)'dir. Tek taraflı üreter obstrüksiyonu oluşturulmuş farelerde ve ratlarda yapılan çalışmalarda bu moleküllerin inhibe edilmesinin apoptozisi, tübüler atrofiyi ve interstisiyel fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (Şekil 2) (55-59).



Şekil 2. Renal interstisiyel inflamasyonun patogenezi.

ARB, anjyotensin reseptör blokörü; CCR1, *chemokine receptor 1*; CCR2, *chemokine receptor 2*; CSF-1, *colony stimulating factor-1*; CST, *cerebroside sulfotransferase*; HO-1, *heme oxygenase-1*; ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*; IκB, NFκB endojen inhibitörü; IL-1, *interleukin-1*; iNOS, *inducible nitric oxide synthase*; MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*; NFκB, *nuclear factor kappa B*; PDGF, *platelet derived growth factor*; ROCK, *Rho-associated coiled-coil forming protein kinase*; TGF-β1, *transforming growth factor-β1*; TNF-α, *tumor-necrosis factor-α*; uPAR, *urokinase receptor*.

Tek taraflı üriner obstrüksiyonu takiben Anjyotensin 2, proinflamatuvar genlerin üretimini sağlayan bir transkripsiyon faktörü olan NFκB'yi aktive eder (60). Aynı zamanda anjyotensinojen geni de NFκB tarafından aktive edilir (61). *Nuclear factor kappa B* proinflamatuvar yolda görevli çok sayıda genin aktivasyonunu kontrol ederek

inflamasyonda merkezi rol oynar. NFkB'nin 232 geni kontrol ettiği bilinmektedir (62). Bu genlerin kodladığı proteinler; sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, immun reseptörler, hücrel bağlantılar ve adezyon molekülleridir. Bu moleküllerden bazıları *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), endotelin 1, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), HO-1, PDGF B, Bcl-2, EGF reseptör, *urokinase receptor* (uPAR), anjiyotensinojen, ICAM 1, fibronektin, IL 1, IL 2 ve IL 6'dır. *Nuclear factor kappa B*'nin aktivasyonunun inhibe edilmesi apoptozisi ve interstisyel fibrozisi azaltır (63). Bu nedenle NFkB, fibrozisin önlenmesinde önemli bir tedavi hedefidir. Anjiyotensin 2 NFkB yanı sıra makrofaj infiltrasyonunu ve interstisyel fibrozisi artıran *Rho-associated coiled-coil forming protein kinase* (ROCK)'ı aktive eden GTPaz Rho aktivitesini de artırır. Farelerde ROCK'ın inhibe edilmesi makrofaj infiltrasyonunu ve interstisyel fibrozisi azaltmıştır (Şekil 2) (64).

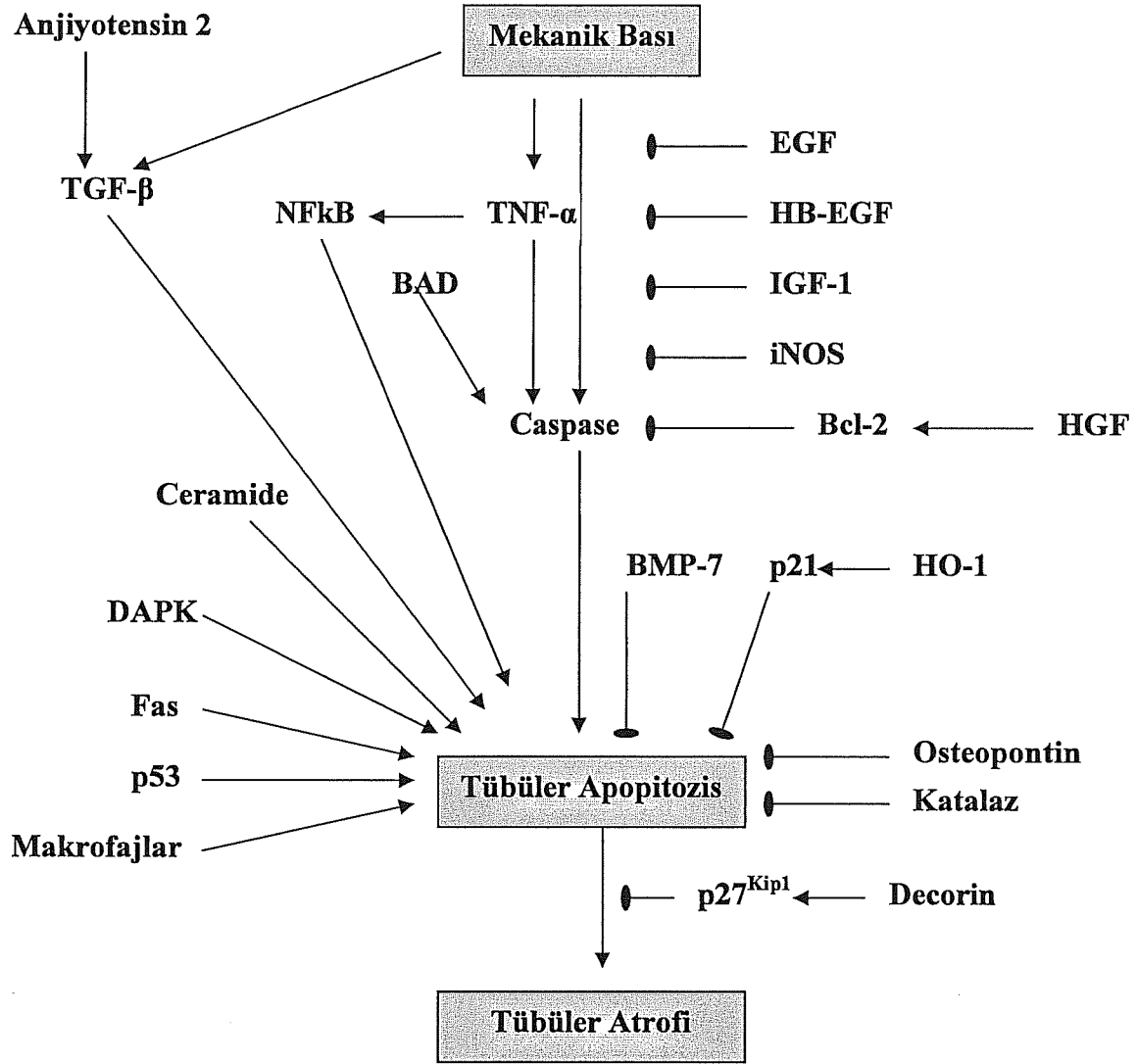
Osteopontin de TÜO'nda yapımı artan glikoprotein yapıda bir moleküldür ve makrofaj infiltrasyonunu ve interstisyel fibrozis gelişmesini artırır (65) *Osteopontin* geni çıkarılmış farelerde TÜO oluşturulduğunda makrofaj infiltrasyonunun ve interstisyel fibrozisin azaldığı ancak tübüler apoptozisin arttığı görülmüş (65). Bu nedenle *osteopontinin* ON'de hem interstisyel fibrozisi arttırdığı hem de tübüllerde koruyucu olduğu görülmüştür (Şekil 2).

Obstrüktif nefropatide uPAR'de benzer şekilde çift etkiye sahiptir. Farelerde uPAR geni çıkarıldığında makrofaj infiltrasyonunun azaldığı ancak PAI-1 düzeyinin artarak tübüler atrofi ve interstisyel fibrozisi arttırdığı görülmüştür (Şekil 2) (66).

2.5.3 Tübüler Apoptozis:

Üriner obstrüksiyon distal tübüler epitel hücrelerinde kromatin ağının büzülerek parçalanması ve sitoplazmik tomurcuklanma oluşması ile karakterize apoptozise neden olur. Renal tübüler apoptozis tübüler atrofi ile sonuçlanır. Kronik TÜO oluşturulmuş farelerde yapılan çalışmalarda proksimal tübül hücrelerinde nekroz, distal ve toplayıcı tübül hücrelerinde apoptozis olduğu görülmüştür. Tek taraflı üreter obstrüksiyonunda proksimal tübüllerde minimal dilatasyon olur ancak hipoksiye bağlı nekroz gelişir. Distal tübül hücreleri ise mekanik bası ile bariz olarak genişler ve apoptozis gözlenir (67, 68). Obstrüktif nefropatide tübüler apoptozise neden olan etkenler mekanik bası,

anjiyotensin 2 artışı, makrofaj infiltrasyonu, *sphingolipid ceramide*, *death associate protein kinase* (DAPK) ve *Fas ligand* artışıdır (Şekil 3) (6).



Şekil 3. Obstrüktif nefropatide renal tübüler apoptozis patogenezi

BMP-7, *bone morphogenetic protein-7*; DAPK, *death associate protein kinase*; EGF, *epidermal growth factor*; HB-EGF, *heparin binding EGF-like growth factor*; HGF, *hepatocyte growth factor*; HO-1, *heme oxygenase-1*; IGF-1, *insulin-like growth factor-1*; iNOS, *inducible nitric oxide synthase*; TGF-β1, *transforming growth factor-β1*; TNF-α, *tumor-necrosis factor-α*.

Mekanik bası tübül hücrelerinde TGF-β üretimini artırır ve TGF-β apoptozise *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK) bağımlı mekanizma ile neden olur. Antagonist antikor ile TGF-β'in tamamen inhibe edilmesi basıya bağlı gelişen apoptozisi bariz olarak azaltır (69). Mekanik basının apoptozisi arttırmasındaki bir

diğer yol *tumor-necrosis factor- α* (TNF- α) üretimini artırmasıdır. Bu yol *caspase* bağımlıdır (70). *Tumor-necrosis factor- α* aynı zamanda NFkB'yi aktive ederek tübüler apopitozisi artırır (71) Onkojenik protein olan Bcl-2 ailesinden proapopitotik etkili Bad ON'de mekanik bası ile defosforile olarak tübüler apopitozisi artırır (72). Antiapopitotik etkisi olan Bcl-2'nin artması ise apopitozisten koruyucu etki yapar. *Hepatocyte growth factor* (HGF) ile lipozom aracılı gen tedavisi yapılması Bcl-2'nin artmasını ve tübüler apopitozisin azalmasını sağlamıştır (73, 74). Mekanik basıya bağlı tübüler apopitozisi önleyen diğer faktörler ise endojen *nitric oxide* üretimi, iNOS gen tedavisi, EGF, IGF-1, HB-EGF'ü artıran tedaviler olduğu gösterilmiştir (75-79).

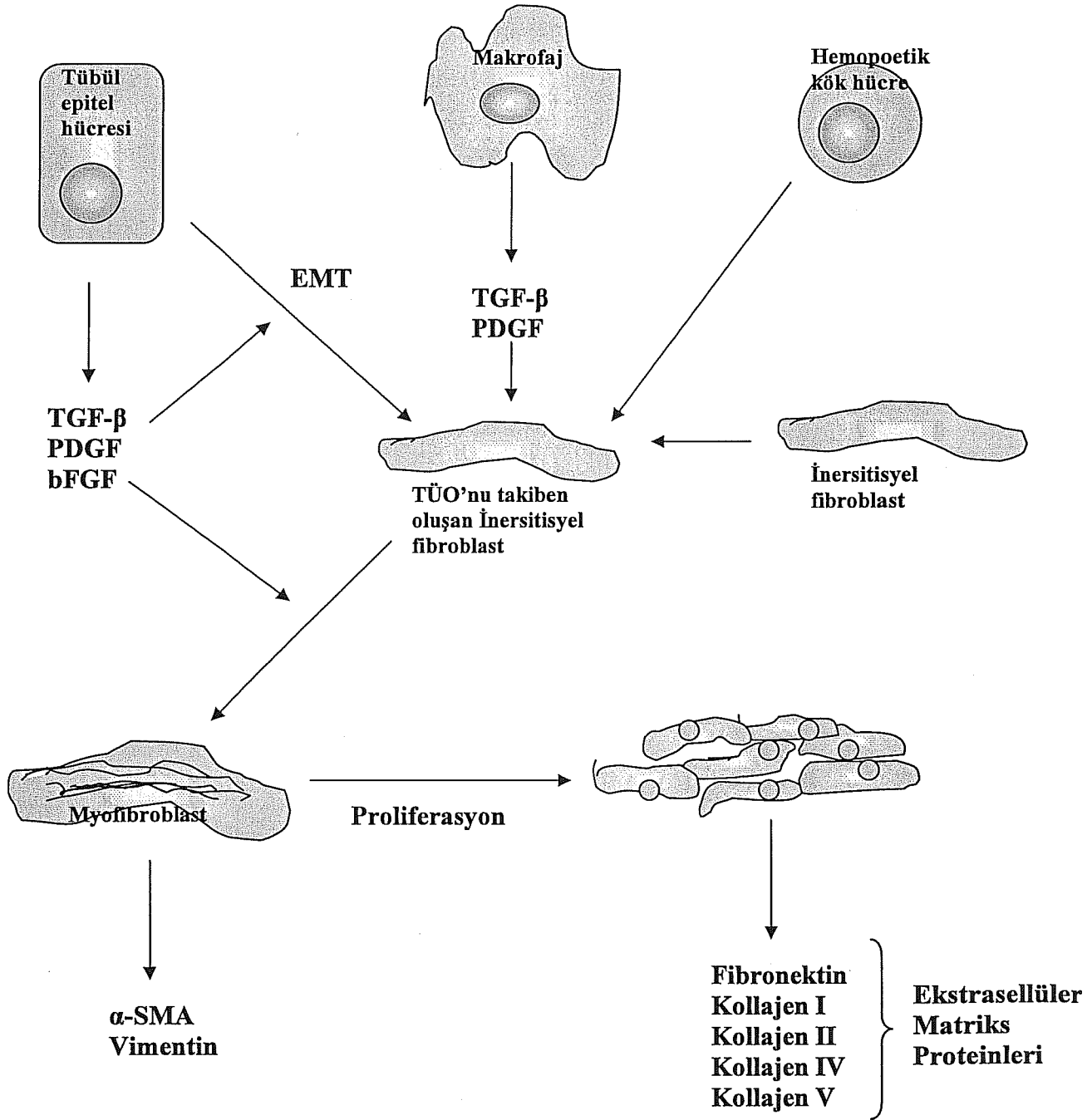
Anjiyotensin 2'de TGF- β yapımını arttırarak renal tübüler hücrelerde apopitozisi artırır. Anjiyotensin 2'nin bu etkisi *hemeoxygenase-1*(HO-1) ile inhibe edilir (80). Diğer bir yöntem tübül hücrelerinin ömrünü uzatmak için HO-1 gen tedavisi olabilir. Düzeyi artan HO-1, p21'i artırarak tübül hücrelerinde apopitozise karşı direnç sağlar.

Tek taraflı üreter obstrüksiyonunda yapımı artan *sphingolipid ceramide* diğer bir apopitozis artırıcı moleküldür. Hipokside *ceramide synthase* renal tübüler hücre ölümünde merkezi rol oynar. Obstrüktif nefropatide *ceramide* oluşmasının engellenmesi tübüler atrofiyi azaltır (81). Artan reaktif oksijen radikalleri de TÜO'nda tübüler apopitozise katkıda bulunur. *Catalase* antioksidan enzimdir ve eksikliğinde tübüler apopitoziste artma görülür. Tek taraflı üreter obstrüksiyonunda *fluvastatin* gibi antioksidanların verilmesinin tübüler apopitozisi azalttığı görülmüştür (82).

2.5.4- İnterstisyel Fibrozis:

Obstrüktif nefropatide en dramatik sonuç bütün kronik böbrek hastalıklarında görülen interstisyel fibrozis gelişmesidir. Fibroblastlar inerstisyel renal fibrozis gelişmesinde temel rolü oynayan hücrelerdir ve normalde böbrek parankiminde kortikal interstisyel alanda ve perivasküler alanda bulunurlar. Obstrüktif nefropatide hasarlanmış tübül boyunca fibroblast birikimi olur. Bu fibroblastların %49'u önceden bölgede blunan fibroblastlardan, %15'i kemik iliğinden, %36'sı ise bazı tübül hücrelerinin epitelial mezankimal transformasyon (EMT)'a uğrayak fibroblasta dönüşmesinden kaynaklanır. Fibroblastlar aktive olarak myofibroblasta dönüşür ve α -

SMA ve vimentin üretmeye başlarlar (6). Çoğalan fibroblastlardan fibronektin, kollajen I, III, IV ve V gibi ekstrasellüler matriks ürünleri sentezlenir ve interstisiyel alanda birikir. Fibronektin ve kollajen prolifer olmuş fibroblastların yanı sıra proksimal tubul epitel hücrelerinde de sentezlenir (83). Fibronektin ve kollajen sentezini PDGF-B ve bFGF artırırken, salınımını TGF- β artırır (84) (Şekil 4).



Şekil 4. Obstrüktif Nefropatide Fibroblast Proliferasyonu

EMT, *epitelial mezankimal transformasyon*; bFGF, *basic fibroblast growth factor*; PDGF, *platelet-derived growth factor*; TGF-β, *transforming growth factor-β*;

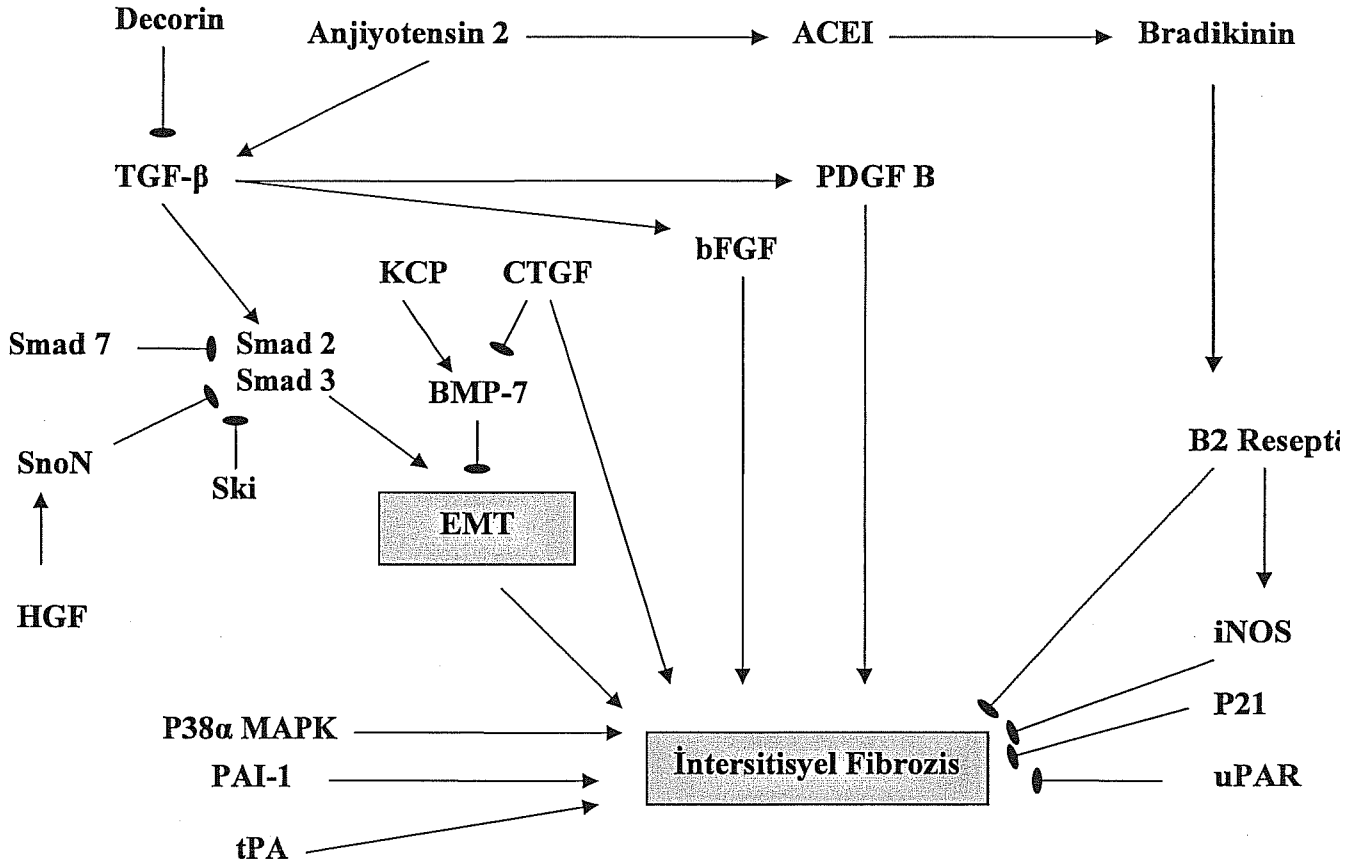
İnterstisiyel fibrozis gelişmesinde anjiyotensin tarafından artırılan TGF- β merkezi rol oynar (6). Kronik tek taraflı üriner obstrüksiyonda interstisiyel fibrozis gelişmesinde anjiyotensinin etkisini araştıran bir çalışmada anjiyotensinojen geni hiç kopyalanmadığında fibrozis oranı %25 iken bir kez kopyalanmasının fibrozis oranını %50 artırdığı ancak 3 ya da 4 kez kopyalanmasının fibrozis oranını değiştirmedeği görülmüş. Sonuç TüO'da interstisiyel fibrozis gelişmesinden %50 anjiyotensin bağımlı yolun sorumlu olduğu anlaşılmıştır (85). Tek taraflı üriner obstrüksiyonda anjiyotensin-dönüştürücü-enzim inhibitörü verilerek yapılan çalışmalarda ratlar yenidoğan dönemindeyken interstisiyel myofibroblast miktarında artma görülürken, yenidoğan döneminden sonra hem anjiyotensin 2'nin azalması hem de bradikininin artması ile fibrozisi azalttığı görülmüştür (Şekil 5) (86).

Tek taraflı üreter obstrüksiyonunda interstisiyel fibrozis gelişmesinde en önemli sinyal yolu TGF- β 'nin yönettiği ve *Smad* transkripsiyon faktörlerinin aracılık ettiği EMT olmasıdır. Mekanik basıya maruz kalmış tübül hücrelerinde ve makrofajlarda üretilen ve anjiyotensin 2 tarafından yapımı artırılan TGF- β , apoptozisi ve *Smad* transkripsiyon faktörlerinin aracılık ettiği EMT'ü artırır (69, 87). Ayrıca PDGF B ve bFGF'nin aktivitesini artırarak da EMT'un artmasına ve interstisiyel fibrozis gelişmesine neden olur (83, 88). Tübül epitel hücrelerinin fenotipik özelliklerini kaybederek mezankimal fenotip kazanmasına neden olan EMT'nun geri dönüşümlü olabileceği gösterilmiş (84). Epiteliyal mezankimal transformasyonda major rol oynayan TGF- β 'nin inhibe edilmesi böbreğin kronik zedelenmesinin ilerlemesini durdurabilir. Tek taraflı üreter obstrüksiyonunu takiben profibrotik *Smad* moleküllerinden olan *Smad 2* ve *Smad 3* yapımı artar, inhibitör etki yapan *Smad 7* ise azalır (87). Tek taraflı üriner obstrüksiyon oluşturulmuş ratlarda *Smad7* gen tedavisi ile *Smad 2* ve *Smad 3* düzeylerinin azalarak fibroblast ve kollajen birikiminin azalttığı gösterilmiştir (89). *Hepatocyte growth factor*'de *Smad 2* ve *Smad 3* üretimini engelleyerek myofibroblast aktivitesini azaltır (Şekil 5) (90).

Transforming growth factor- β tarafından kontrol edilen diğer fibrojenik moleküller PDGF B, bFGF ve *connective-tissue growth factor* (CTGF)'dür (6, 83, 88). *Platelet-derived growth factor B* ve bFGF'nin fibroblast proliferasyonu, fibroblastın myofibroblastta dönmesi ve EMT'un aktive edilmesinde rolü vardır (83, 88, 91). Tek taraflı üreter obstrüksiyonunda PDGF reseptör blokörü uygulanmasının interstisiyel

fibrozisi azalttığı görülmüştür (92). Bir başka çalışmada p38 α MAPK inhibisyonunun renal TGF- β üretimi devam etmesine rağmen CTGF düzeyini azaltarak interstisiyel fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (93). Bu çalışma p38 α MAPK blokajının antifibrotik terapötik etkinliği olduğunu göstermiştir (Şekil 5).

Plazminojen-plazmin aksının da interstisiyel fibrozis gelişmesinde rolü vardır. Tek taraflı üreter obstrüksiyonunda PAI-1 ve *tissue-type plasminogen activator* (tPA) düzeylerinin arttığı görülmüştür (94). *Plasminogen activator inhibitor-1* ve tPA moleküllerinin ortadan kaldırıldığı çalışmalarda interstisiyel fibrozisin azaldığı görülmüştür (Şekil 5)(95, 96).



Şekil 5. Obstrüktif nefropatide interstisiyel fibrozis patogenezi

ACEI, *angiotensin-converting-enzyme inhibitor*; B2, *bradykinin 2*; BMP-7, *bone morphogenetic protein-7*; CTGF, *connective tissue growth factor*; EMT, *epitelyal mezankimal transformasyon*; HGF, *hepatocyte growth factor*; iNOS, *inducible nitric oxide synthase*; KCP, *kielin/chordin-like protein*; p21CIP1/WAF1, p38 α MAPK, *p38 α mitogen-activated protein kinase*; PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1*; PDGF, *platelet-derived growth factor*; SnoN, *Ski-related novel protein N*; TGF- β , *transforming growth factor- β* ; tPA, *tissue-type plasminogen activator*; uPAR, *urokinase receptor*.

Tübül epitel hücrelerinin fenotipik özelliklerini kaybederek mezankimal fenotip kazanmasına neden olan EMT'nun geri dönüşümlü olabileceği gösterilmiştir (84). Epiteliyal mezankimal transformasyonu inhibe edecek ilaç tedavileri böbreğin kronik zedelenmesinin ilerlemesini durdurabilir. Bu nedenle ON'de fibrozis önlemek için EMT'da temel rol oynayan TGF- β , PDGF B ve bFGF üretiminin baskılanmasını hedef alan tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve bu faktörlerin patogenezdaki rollerinin araştırılması önemlidir (5, 83, 97).

2.6. Obstrüktif Nefropatide Deneysel Farmakolojik Tedavi Yaklaşımları:

Üriner obstrüksiyon prenatal erken dönemde gelişebilir. Bu dönemde gelişen obstrüksiyon böbrek büyümesini ve maturasyonunu etkileyebilir. Şiddetli obstrüksiyon varlığında intrauterin cerrahi düzeltme yapılması böbrek büyümesi tamamlanana kadar böbrek kitlesinin korunmasını sağlayabilir. Ancak prenatal dönemde idrar yolu obstrüksiyonunun şiddetini gösteren uygun bir belirteç yoktur. Benzer şekilde postnatal dönemde de hidronefroz varlığında obstrüksiyon şiddetini gösteren ve cerrahi düzeltme endikasyonunu belirleyen belirteçler yoktur. Bu nedenle hangi hastaların cerrahi düzeltmeden fayda göreceği tartışmalıdır (67).

Bir diğer önemli nokta cerrahi düzeltmenin sonuçlarıdır. Yapılan deneysel bir çalışmada yenidoğan ratlara 5 gün süre ile TÜO uygulanmış ve 5. gün sonunda obstrüksiyon düzeltilmiş. Tek taraflı obstrüksiyonun 5. gününde glomerüler filtrasyon hızının(GFH) azaldığı, renin düzeyinin arttığı, glomerül sayısının %40 oranında azaldığı, tübüllerde proliferasyonun azaldığı, apoptozisin arttığı, tübüler EGF üretimi azalırken TGF- β , *clusterin*, *vimentin* ve *α -sma* düzeylerinin arttığı, interstisyel alanda kollajen birikiminin arttığı görülmüştür. Tek taraflı obstrüksiyon düzeltildikten 28 gün sonra bu parametreler tekrar değerlendirildiğinde GFH'nın normale döndüğü ancak glomerül sayısındaki %40 kaybın devam ettiği, EGF düzeyinin arttığı, TGF- β , *clusterin* ve *vimentin* düzeylerinin azaldığı ancak normal seviyeye dönmediği gösterilmiştir. Obstrüksiyonun düzeltilmesi sonrasında GFH'nın normale dönmesinin kalan glomerüllerin hipertrofiye uğraması ile olduğu düşünülmüştür (4). Bir diğer çalışmada TÜO oluşturulan ve 5. günden sonra obstrüksiyonun düzeltildiği ratlar 1. yılın sonunda tekrar değerlendirilmiş ve glomerül sayısının %40 azaldığı, karşı böbrekte kompanzatuvar hipertrofi gelişmesine rağmen GFH'nın %80'e düştüğü, proteinürinin

arttığı ve hem TÜO oluşturulan böbrekte hem de sağlam olan diğer böbrekte gomerüloskleroz, tübüler atrofi, makrofaj infiltrasyonu ve interstisiyel fibrozisin belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (3). Bu çalışmaların sonucunda ON tedavisinde cerrahi düzeltmenin yanı sıra fibrozis gelişmesini önlemek için antifibrotik ajanların tedaviye eklenmesinin uygun olacağı düşünülmüştür.

Günümüze kadar çeşitli ajanların deneysel TÜO modelinde fibrozis üzerine etkileri araştırılmıştır. Aşağıdaki tabloda seçilen tedavi stratejilerinin fibrozis üzerine etkileri özetlenmiştir (98)

Tablo II. Obstrüktif nefropatide tedavi stratejilerinin fibrozis üzerine etkileri

Hedef	Strateji	Kollajen	Apoptozis	Myofibroblast	Makrofaj	TGF β 1
Anj 2	ACE inhibitörü	Azaldı	Bilgi yok	Azaldı	Azaldı	Azaldı
Anj 2	AT1 antagonisti	Azaldı	Bilgi yok	Azaldı	Değişmedi	Azaldı
Anj 2	AT2 antagonisti	Yükseldi	Azaldı	Azaldı	Değişmedi	Değişmedi
Anj 2	AT2 genin çıkarılması	Yükseldi	Azaldı	Çoğaldı	Değişmedi	Bilgi yok
TGF β 1	1D11 Antikor	Azaldı	Azaldı	Bilgi yok	Bilgi yok	Azaldı
TGF β 1	Antisense	Azaldı	Bilgi yok	Azaldı	Değişmedi	Azaldı
iNOS	Genin çıkarılması	Yükseldi	Çoğaldı	Bilgi yok	Çoğaldı	Çoğaldı
Nitrik oksit	Arginine (NO)prekürsör	Azaldı	Bilgi yok	Azaldı	Azaldı	Değişmedi

Anj 2, Anjiyotensin 2, ACE, angiotensin konverting enzim; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentetaz; TGF β 1, transforming growth faktör- β 1

Statin grubu ilaçlar ve Epo obstrüktif nefropatide fibrozis üzerine etkileri araştırılan ajanlardandır.

2.6. Statinlerin Antifibrotik Etkinliği

Statin grubu ilaçlar 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri olup kolesterol sentezini baskırlar ve yaygın olarak hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılırlar. Antihiperlipidemik etki yanı sıra statinlerin antiinflamatuvar, antiproliferatif ve immunomodülatör etkilerinin olduğu gösterilmiştir (99, 100). Statinlerin fibrozisten koruyucu özellikleri hipertansiyona bağlı vasküler

hasar, siklosporin toksitesi, diyabetik nefropati ve ON gibi deneysel böbrek hastalığı modellerinde çalışılmıştır (8, 101, 102, 103). Statinler antiinflamatuvar etkilerini transkripsiyon faktörü olan NFkB sinyal yolunu bloke ederek yaparlar (104). Statin grubu ilaçlardan simvastatinin NFkB'yi inhibe etmesinin TNF- α 'nın NFkB'yi indükleyerek neden olduğu apoptozisi azalttığı gösterilmiştir (11). Bir başka çalışmada da statinlerin glomerüler mesangial hücrelerde hipergliseminin ve anjiyotensin 2'nin indüklediği *janus kinase /signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT) yolunu bloke ettiği gösterilmiştir (9). Aynı zamanda statinlerin antifibrotik etkinliğini anjiyotensin 2 tarafından aktivitesi artırılan ve interstisiyel fibrozise neden olan Rho/ROCK yolunu ve p38 MAPK'ı bloke ederek gerçekleştirdiği gösterilmiştir (105).

2.6. Eritropoetin Antifibrotik Etkinliği

Eritropoetin eritroid prekürsör hücrelerin diferansiyasyonunu ve proliferasyonunu regüle eden hematopoetik bir faktördür (106). Biyolojik etkisi Epo'nin eritroid prekürsör hücrelerin yüzey reptörleri (EPO-R) ile spesifik etkileşimi ile oluşur. Bu EPO-R'ler endotelial hücreler, nöronlar ve trofoblast hücreler gibi hematopoetik olmayan hücrelerde de bulunur (107-109). Bu hücrelerde Epo'in EPO-R ile etkileşmesinin anjiyogenezisi artırarak doku oksijenizasyonunu artırdığı ve bu sayede antiapoptotik etkisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır (110). Deneysel olarak oluşturulan siklosporine bağlı nefropatide recombinant human eritropoetin (rhEPO)'nin proinflamatuvar sitokinlerden osteopontin ve C-reaktif protein düzeyini ve profibrotik mediyatörlerden TGF- β düzeyini azaltarak ve apoptozisi düzenleyen genlerden *Bcl-2*'yi artırıp *caspase-3*'ü azaltarak interstisiyel fibrozis ve apoptozis üzerine renoprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir (17). Yapılan bir başka çalışmada da rhEPO'nin tek taraflı üreter obstrüksiyonu oluşturulmuş ratlarda obstrüktif nefropatide TGF- β , α -SMA ve fibronektin düzeylerini azaltarak renoprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir.

3-GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji Bilim Dalı tarafından Patoloji ve Üroloji Anabilim Dallarının katkıları ile yapıldı. Çalışmanın deneysel aşaması Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma öncesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan (29/11/2007-28) onay alındı. Deneyde cerrahi araştırma merkezinde yetistirilen, standart yem ve çeşme suyu ile beslenen, aynı odada 12 saat gece ve 12 saat gündüz ortamında tutulan 48 adet 200-250gr ağırlığında Sprague Dawley cinsi rat kullanıldı.

Cerrahi İşlemler

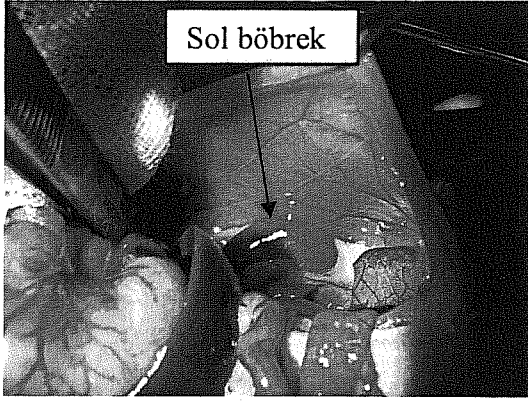
Deneye alınan tüm ratlara cerrahi işlemden önce sefazolin sodyum 20mg/kg dozunda IM yolla verilerek cerrahi antibiyotik profilaksisi yapıldı. Anestezi 5-13 mg/kg ksilazin hidroklorür ve 40-87 mg/kg ketaminin IM enjeksiyonu kombinasyonu ile sağlandı. Ratların karin cildi tıraşlandıktan sonra iyot ile temizlenip, ventral orta hat kesi ile abdominal kaviteye girildi. Göbek altı medyan kesi ile karin içine girildi (Resim 1,2). On iki ratın üreterleri bağlanmadan batını kapatıldı ve sham grubu olarak ayrıldı. Diğer 36 ratın sol üreter ve sol böbreği ortaya çıkarıldı (Resim 3). Sol üreter üreteropelvik bileşkenin hemen altından 5-0 prolen ile bağlandı ve üreter kesildi (Resim 4, 5). Batın kapatıldıktan sonra ratlar iyileşmesi için kafeslere alındı.



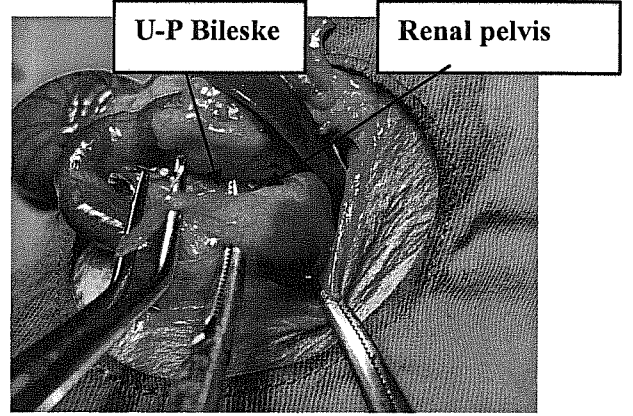
Resim 1: Karin ön cildinin hazırlanması



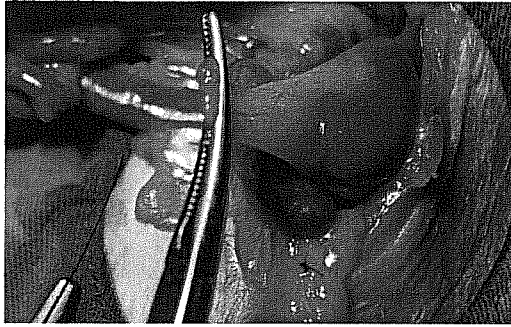
Resim 2: Karin ön duvarı kesisi



Resim 3: Sol böbrek



Resim 4: Sol üreteropelvik(U-P) Bileske



Resim 5: Obstrüksiyon uygulanmış sol üreter

Tek taraflı obstrüksiyon yapılan 36 rat 3 gruba ayrıldı ve cerrahi işlem sonrası 1. günden itibaren 14 gün süresince tedavi verildi.

Çalışma Grupları:

Sham Grubu: Tek taraflı üreter obstrüksiyonu yapılmayan ve tedavi verilmeyen 12 rat içermektedir.

Eritropoetin Grubu (Epo Grubu): Tek taraflı üreter obstrüksiyonu yapılan 12 rat içermektedir. Bu gruba cerrahi sonrası 1. günden itibaren 14 gün süresince 1000U/kg epoetin alfa (Gürel) gün asiri intraperitoneal yoldan verilmiştir (Resim 6).

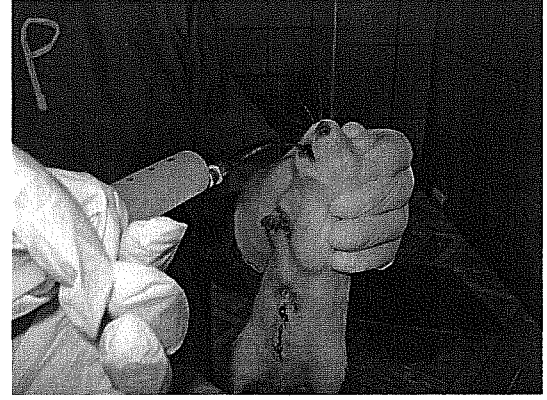
Simvastatin Grubu (Simv Grubu): Tek taraflı üreter obstrüksiyonu yapılan 12 rat içermektedir. Bu gruba cerrahi sonrası 1. günden itibaren 14 gün süresince günde 2 kez Simv (Eczacıbaşı) 2mg/kg dozunda %1'lik karboksimetilsellüloz solüsyonu içinde

çözünmüş olarak gavaj ile oral yoldan verilmiştir. Bu doz ve uygulama yolu Simv ile yapılmış daha önceki çalışmalarda kan lipid seviyesini degistirmedigi gözlenen doz ve yöntemdir (8, 111).

Kontrol Grubu: Tek taraflı üreter obstrüksiyonu yapılan 12 rat içermektedir. Bu gruba cerrahi sonrası 1. günden itibaren 14 gün süresince günde 2 kez %1'lik karboksimetilsellülöz solüsyonu 1ml/kg dozunda gavaj ile oral yoldan verilmiştir.

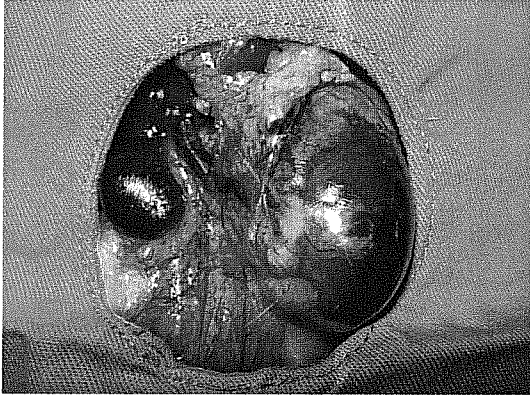


Resim 6: Eritropoetin intraperitoneal verilmesi

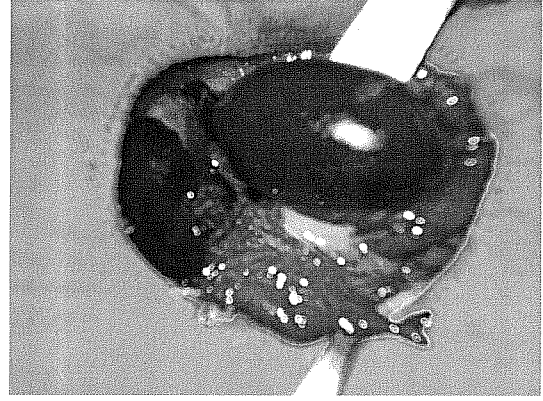


Resim 7: Simvastatin gavaj ile oral verilmesi

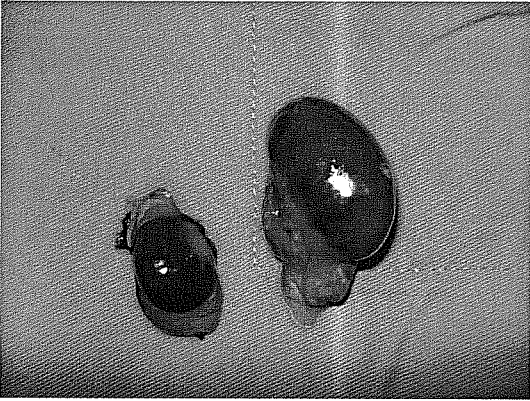
Ondördüncü günün sonunda sham grubu, Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubunda bulunan ratlara 5-13mg/kg ksilazin hidroklorür ve 40-81 mg/kg ketamin im. enjeksiyonu kombinasyonu ile anestezi sağlandıktan sonra abdominal duvar kesisi yapılarak ve histolojik çalışma için sol böbrekleri çıkarıldı (Resim 7, 8, 9). Deneklerin sol böbrekleri önce içinde serum fizyolojik bulunan kabin içerisine atıldı (kan hücrelerinin temizlenmesi için) sonra %10 luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonunda tespit edildi (Resim 10, 11)



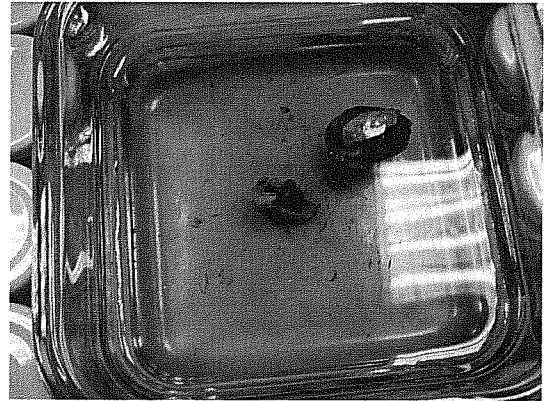
Resim 8: Hidronefroz olmuş sol böbrek normal sağ böbrek



Resim 9: Hidronefrotik sol böbrek çıkarılması



Resim 10: Hidronefroz olmuş sol böbrek normal sağ böbrek



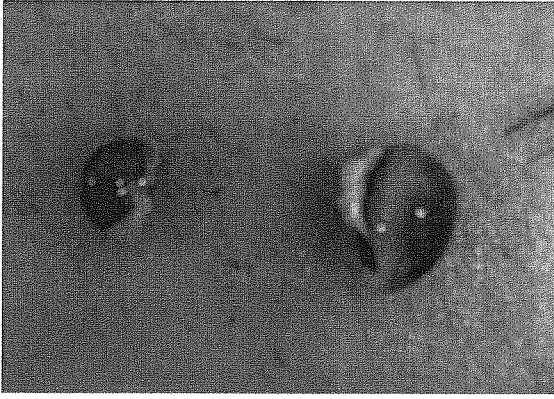
Resim 11: Serum fizyolojik içeren kap



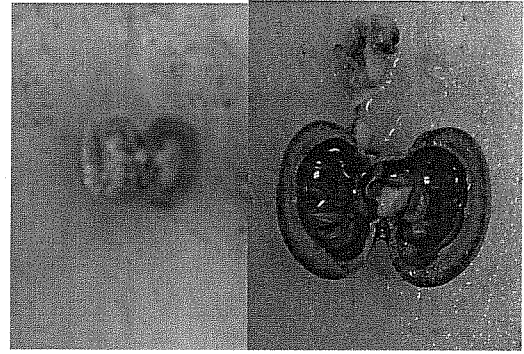
Resim 12: Formaldehit içinde hidronefrotik sol böbrek

Patolojik Inceleme

Yüzde 10'luk formaldehit içinde tespit edilen böbrekler, koronal kesit alınarak doku takip işlemine alındı (Resim 12,13). Hazırlanan parafin bloklardan 4µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler interstisiyel fibrozisi göstermek için Masson trikrom ile boyandı. Fibrozis gelişmesinde rolü olan TGF-β, PDGF B, bFGF, NFκB ekspresyonu ve fibrozisde dokuda biriken fibronektin immunohistokimyasal yöntem ile çalışıldı. Örnekler etiketlenerek grupları gizlendi ve patolog BC gözetiminde tez asistanı tarafından değerlendirildi.



Resim 13: Formaldehit ile tespit edilmiş böbrek



Resim 14: Formaldehit ile tespit edilmiş böbrek

Immunohistokimya

Immunohistokimyasal uygulama her bir antikor için tüm gruplara tek seansta uygulanmıştır. Streptavidin-biotin peroksidaz saptama yöntemi kullanılmış olup kullanılan primer antikorlar ve yapılan uygulamalar Tablo III'de özetlenmiştir.

Tablo III- İmmunohistokimyasal çalışmada kullanılan primer antikorlar

Primer Antikor	Klon; Tip	Dilüsyon	İ.S	Antijen açığa çıkarma işlemi	Firma
TGF β	Monoklonal, Mouse	1:50	90'	Na sitrat 60' Proteinaz K 15'	SantaCruz, USA
NF κ B	Poliklonal, rabbit	1:200	60'	Na sitrat 30'	GeneTex, USA
bFGF	Monoklonal, Mouse	1:25	180'	Na sitrat 60'	GeneTex, USA
PDGF B	Monoklonal, rabbit	Hazır kit	15'	Na sitrat 35'	Thermo Scientific, USA
Fibronektin	Poliklonal, rabbit	1:50	90'	Na sitrat 30'	GeneTex, USA

Adeziv kaplı lama hazırlanan 4 μ m kalınlığındaki parafin kesitler 57°C'lik etüvde 16 saat bekletildikten sonra aşağıdaki immunohistokimyasal çalışma basamakları uygulandı:

1. Dereceli alkolde deparafinizasyon tamamlandı.
2. Distile su ile yıkanan kesitler soğuk %100'lük metanol içinde %3'lük hidrojen peroksit içeren solüsyonda 30 dakika bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi.
3. PBS (fosfate buffer saline, PH: 7,4) solüsyonu ile yıkama sonrası primer antikora göre antijen açığa çıkarma işlemi uygulandı. (Bkz. Tablo-3).
4. Deterjanlı PBS (bir damla Tween 20 içeren) ile yıkama yapıldıktan sonra bloking solusyonunda 30 dakika bekletildi.
5. Yıkama yapılmadan primer antikor ile Tablo III'de gösterilen dilüsyonda oda ısısında inkübasyon yapıldı.
6. Deterjanlı PBS ile yıkama yapıldıktan sonra biotin ile işaretli bağlayıcı sekonder antikor (rabbit&mouse) ile 30 dakika inkübe edildi.
7. Deterjanlı PBS ile yıkandıktan sonra streptavidin-konjuge peroksidaz ile 30 dakika inkübasyon uygulandı.
8. PBS ile yıkandıktan sonra kromojen olarak kullanılan diaminobenzidin solüsyonunda 10 dakika bekletildi.

9. Musluk suyunda yıkandıktan sonra 10 saniye Harris' hematoksilende tutularak nükleus boyanması yapıldı.
10. Musluk suyunda yıkandı.
11. Dereceli alkolde dehidrasyon ve ksilen ile şeffaflaştırma yapılarak lamel ile kapatıldı.

Negatif kontrol olarak primer antikor olmaksızın PBS ile inkübe edilen örnek kullanıldı ve bu örneklerde boyanma saptanmadı.

İmmunohistokimyasal Değerlendirme

TGF-β, NFκB, PDGF B ve bFGF Değerlendirilmesi:

TGF β, PDGF B, NFκB ve bFGF için tübül epitellerinde ve interstisyel inflamatuvar hücrelerdeki sitoplazmik boyanma pozitif iç kontrol olarak kabul edildi. Her bir kesit immunohistokimyasal boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu açısından değerlendirildi. Boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu nokta sayma metodu ile kantitatif olarak yapıldı (112). Her bir kesitte iç korteks bölgesinde birbiri üzerine binmeyen 10 büyük büyütme alanı (40x magnifikasyon) Olympus BX51 mikroskopta değerlendirildi. Her bir alan Olympus DP71 kamera ile bilgisayar ekranına aktarılıp üzerine elle hazırlanmış 2500µm² lik (50x50µm'lik) otuz iki (4x8 adet) kareye ayrılmış şablon yerleştirildi. Boyanma yaygınlığı için pozitif boyalı kareler sayıldı ve aşağıdaki formül kullanılarak pozitif boyalı alan yüzdesi hesaplandı:

$$\text{Pozitif boyalı \% alan} = \frac{\text{Pozitif boyalı kare sayısı}}{\text{Tüm alandaki kare sayısı}} \times 100$$

Pozitif boyalı % alan 0'dan 4'e kadar skorlandı. Yaygınlık skoru 0: boyanma yok, 1: pozitif boyalı alan <%25, 2: %25-50, 3:%50-75, 4: %75-100 olarak belirlendi.

Boyanma yoğunluğu 0-3 arasında derecelendirildi. Derecelendirmede boyanma yok: 0, hafif boyanma (sitoplazmada hafif boyanma var, nükleusta boyanma yok): 1, orta şiddette boyanma (sitoplazmada daha belirgin boyanma var, nükleusta boyanma var/yok): 2, şiddetli boyanma (sitoplazmada ve nükleusta yoğun boyanma var): 3 olarak ifade edildi. Bilgisayar ekranında derecesi 0, 1, 2 veya 3 olan kareler sayılarak önce her bir alanın daha sonra da o denek için ortalama yoğunluk derecesi hesaplandı

Her bir denek için hesaplanan yaygınlık ve yoğunluk skoru toplanarak kombine skor elde edildi (min 0- max 7).

Fibronektin ve Masson trikrom boyanmasının değerlendirilmesi:

Her bir kesitte korteks ve kortiko-meduller bölgede birbiri üzerine binmeyen 10 ayrı alanın 40x büyütmede fotoğrafı OlympusBX51 mikroskop ve üzerine monte edilmiş Olympus DP71 kamera kullanılarak çekildi. Fibronektin ve Masson trikrom ile boyalı alanın hesaplanması için image J programı kullanıldı (113). Her bir alanda tübül boşlukları, bowman kapsülü boşluğu, büyük damarların boşlukları işaretlenip çıkarılarak tüm alan hesaplandı. Sonra pozitif boyalı alanlar işaretlenerek hesaplandı ve aşağıdaki formül kullanılarak pozitif boyalı alan yüzdesi hesaplandı:

$$\text{Pozitif boyalı \% alan} = \frac{\text{Pozitif boyalı alan} \times 100}{\text{Tüm alan}}$$

İstatistik

İstatistiksel değerlendirme Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 16.0 programında yapıldı. Veriler değerlendirilirken sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel analizlerde değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Veriler normal dağılıma uymadığı için gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Grupların ikili karşılaştırılmasında Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. Bu testte istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.01$ kabul edildi.

4-BULGULAR

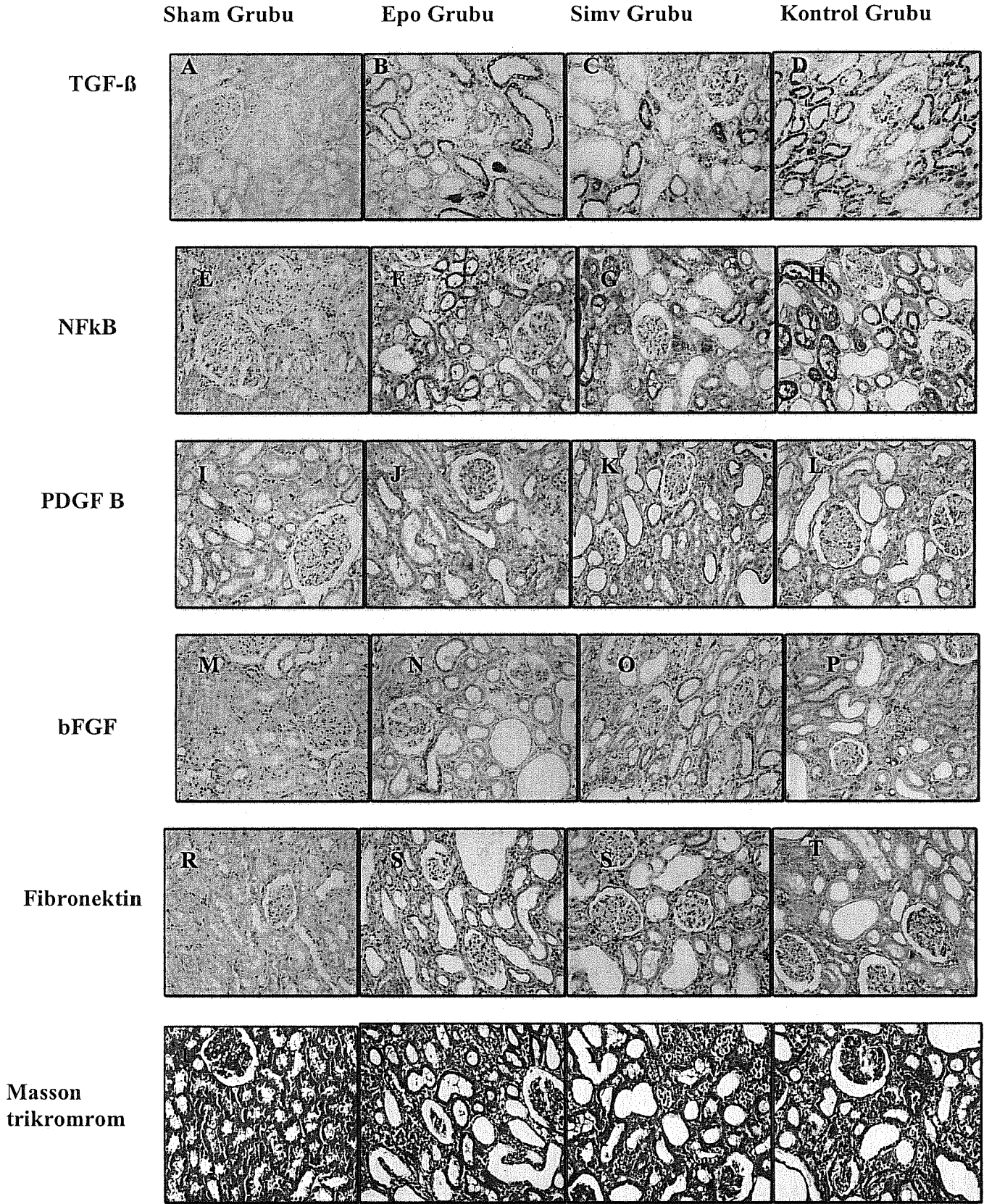
Çalışmaya alınan 48 ratın hepsi çalışmayı tamamladı. Obstrüksiyon oluşturulan tüm böbreklerde hidronefroz olduğu görüldü.

Morfolojik Değerlendirme:

Obstrüksiyon oluşturulmayan sham grubunda morfolojik olarak tübül yapılarının ve tübülointerstisiyel alanın normal olduğu ve TGF- β , NFkB, PDGF B, bFGF ve fibronektin immunohistokimyasal boyanmasında hafif yoğunlukta boyanma olduğu görüldü (Resim 15). Obstrüksiyon oluşturulan Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubunda proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon, tübüler atrofi ve tübülointerstisiyel alanda fibröz genişleme olduğu, glomerül yapılarının ise korunduğu görüldü (Resim 15).

İmmunohistokimyasal ve Masson Trikrom Boyanmanın Değerlendirilmesi:

Obstrüktif nefropati oluşturulan Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubunda TGF- β , NFkB, PDGF B ve bFGF immunohistokimyasal boyanmasında tübül hücreleri sitoplazmasında, NFkB'de tübül epiteli stoplazması ile birlikte nükleer boyanma görüldü (Resim 15). Fibronektin için tübül hücreleri sitoplazmasında ve interstisiyel alanda boyanma görüldü (Resim 15). Fibroziste kollajen birikimini gösteren Masson trikrom boyama ile interstisiyel alanda mavi renkte boyanma görüldü (Resim 15). Tüm boyalarda kontrol grubunda en yoğun boyanma saptandı.



Resim 15. Obstrüktif nefropatide TGF- β , NF κ B, PDGF B, bFGF ve Fibronektinin immunohistokimyasal yöntem ile boyanmasının ve kollajen birikimi için Masson

trikrom boyanmasının görüntüleri. **A-D:** TGF- β sham grubunda hafif yoğunlukta boyanma, kontrol grubunda en fazla olmak üzere diğer gruplarda tübül epiteli sitoplazmasında boyanma. **E-H:** NFkB sham grubunda hafif yoğunlukta boyanma, kontrol grubunda en fazla olmak üzere diğer gruplarda tübül epiteli sitoplazmasında ve yoğun boyanmalarda nükleusta boyanma. **I-L:** PDGF B sham grubunda hafif yoğunlukta boyanma, kontrol grubunda en fazla olmak üzere diğer gruplarda tübül epiteli sitoplazmasında boyanma. **M-P:** bFGF sham grubunda hafif yoğunlukta boyanma, kontrol grubunda en fazla olmak üzere diğer gruplarda tübül epiteli sitoplazmasında boyanma. **R-T:** Fibronektin sham grubunda hafif yoğunlukta boyanma, kontrol grubunda en fazla olmak üzere diğer gruplarda tübül epiteli sitoplazmasında ve interstisyel alanda boyanma. **U-Z:** Masson trikrom sham grubunda boyanma yok, Epo grubu ve Simv grubunda interstisyel alanda mavi boyalı fibrozis alanları, kontrol grubunda bu alanlarda belirgin artma.

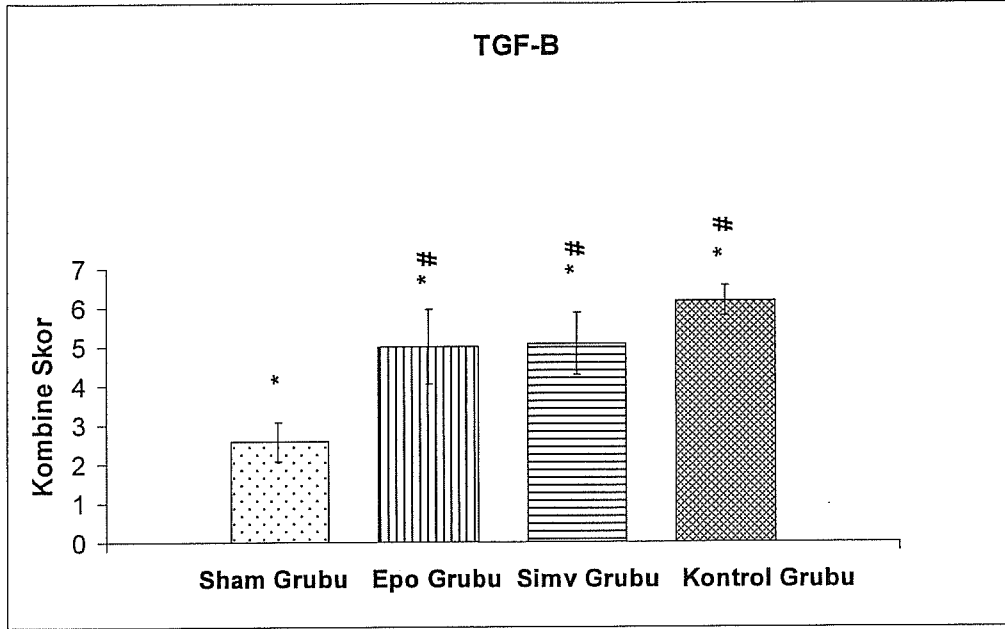
Obstrüktif nefropatide fibrozis gelişmesinde düzeyleri artan TGF- β , NFkB, PDGF B, bFGF, fibronektin ve Masson trikrom boyama ile gösterilen interstisyel fibrozisin çalışma grupları arasında karşılaştırılması Tablo IV'de gösterildi. *Transforming growth factor- β* , NFkB, PDGF B ve bFGF için yaygınlık ve yoğunluk skorlarının toplamı ile elde edilen kombine skor ortalama \pm standart sapma değerleri, fibronectin ve Masson trikrom boyanmasında pozitif % alan ortalama \pm standart sapma değerleri kullanıldı.

Tablo IV- TGF- β , NFkB, PDGF B, bFGF kombine skor ortalama (\pm SD) değerlerinin ve fibronektin, Masson trikrom için % alan ortalama (\pm SD) değerlerinin karşılaştırılması

	Sham Grubu	Epo Grubu	Simv Grubu	Kontrol Grubu	P
TGF- β ort \pm SD	2.67 \pm 0.49	5.00 \pm 0.95	5.08 \pm 0.79	6.17 \pm 0.38	<0.01 *
NFkB ort \pm SD	3.17 \pm 0.57	4.33 \pm 0.77	5.08 \pm 0.90	5.58 \pm 0.51	<0.01 †
PDGF B ort \pm SD	2.50 \pm 0.52	5.67 \pm 0.88	5.33 \pm 0.88	6.25 \pm 0.75	<0.01 †
bFGF ort \pm SD	2.08 \pm 0.28	4.75 \pm 0.86	5.42 \pm 0.79	5.67 \pm 0.77	<0.01 §
Fibronektin ort \pm SD	5.30 \pm 2.49	12.7 \pm 5.03	20.35 \pm 6.47	38.44 \pm 19.44	<0.01 ¥
Masson Trikrom ort \pm SD	4.79 \pm 1.84	21.79 \pm 8.53	26.35 \pm 5.44	39.45 \pm 1.20	<0.01 £

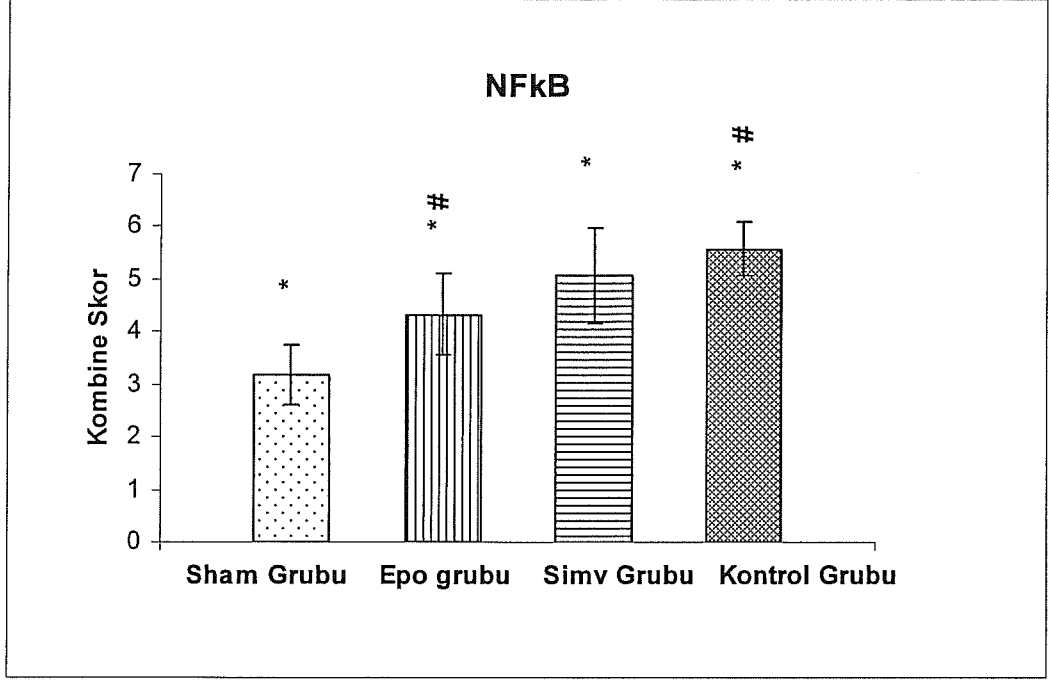
*Sham grubu ile Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu, * kontrol grubu ile Epo grubu ve Simv grubu
† Sham grubu ile Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu, † kontrol grubu ile Epo grubu
† Sham grubu ile Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu,
§ Sham grubu ile Epo grubu, § Simv grubu ve kontrol grubu, § kontrol grubu ile Epo grubu
¥ Sham grubu ile Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu, ¥ kontrol grubu ile Epo grubu ve Simv grubu,
¥ Epo grubu ile Simv grubu
£ Sham grubu ile Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu, £ kontrol grubu ile Epo grubu ve Simv grubu

Sham grubunda TGF- β doku ekspresyonu; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha dūřuk bulundu ($p < 0.01$). Eritropoetin grubu ve Simv grubunda ise kontrol grubuna gōre TGF- β ekspresyonunun anlamlı olarak daha dūřuk olduğu gōrōldō ($p < 0.01$). Ancak TGF- β ekspresyonu açısından Epo grubu ve Simv grubu arasında anlamlı fark gōrōlmedi (şekil 6).



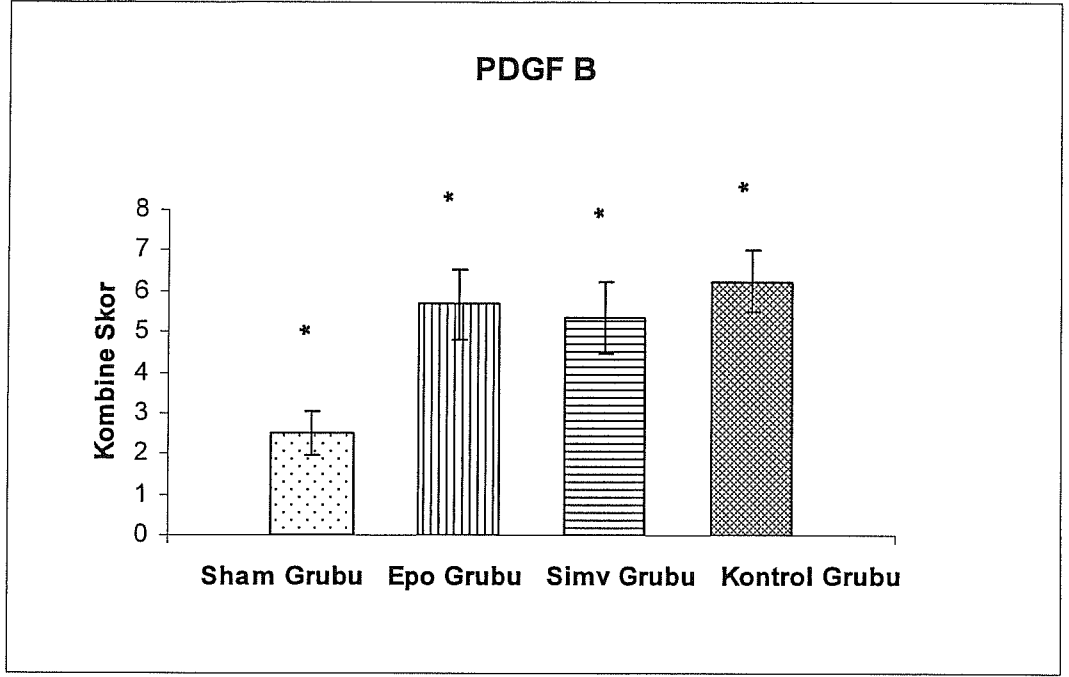
Şekil 6. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin TGF- β ekspresyonu üzerine olan etkileri. * $p < 0.01$ Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubunun sham grubu ile karşılaştırılmaları. # $p < 0.01$ Epo grubu ve Simv grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılmaları.

Sham grubunda NF κ B doku ekspresyonu; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p < 0.01$). Eritropoetin grubunda NF κ B ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p < 0.01$) Simv grubunda ise NF κ B ekspresyonu kontrol grubuna göre daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi. *Nuclear factor kappa B* ekspresyonu Epo grubunda Simv grubuna göre daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi (Şekil 7).



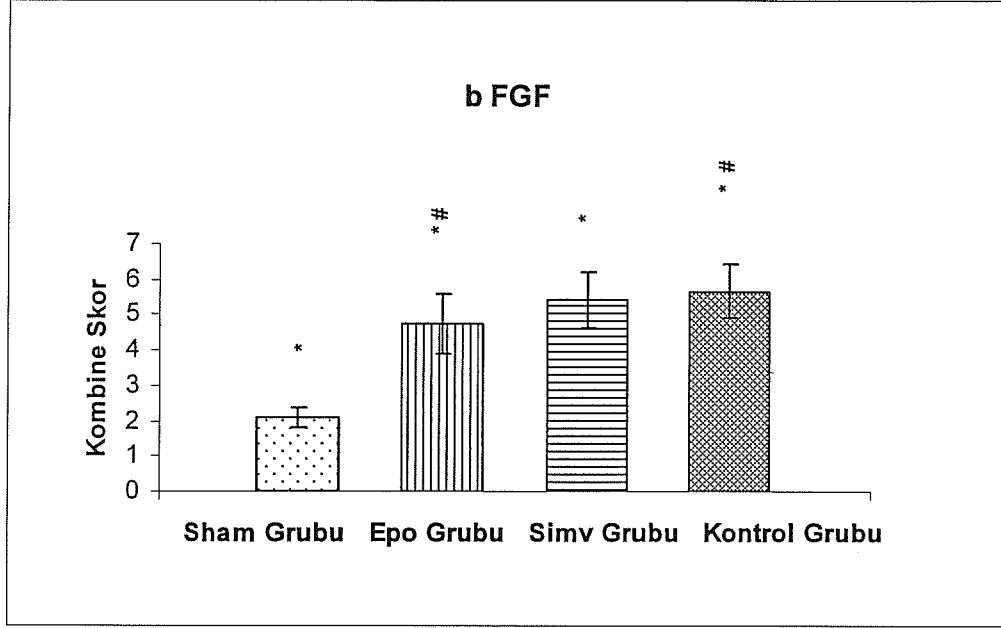
Şekil 7. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin NFkB ekspresyonu üzerine olan etkileri. * $p < 0.01$ Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubunun sham grubu ile karşılaştırılmaları. # $p < 0.01$ Epo grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Sham grubunda PDGF B doku ekspresyonu; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p < 0.01$). Eritropoetin grubu ve Simv grubunda PDGF B ekspresyonu kontrol grubuna göre daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi (Şekil 8).



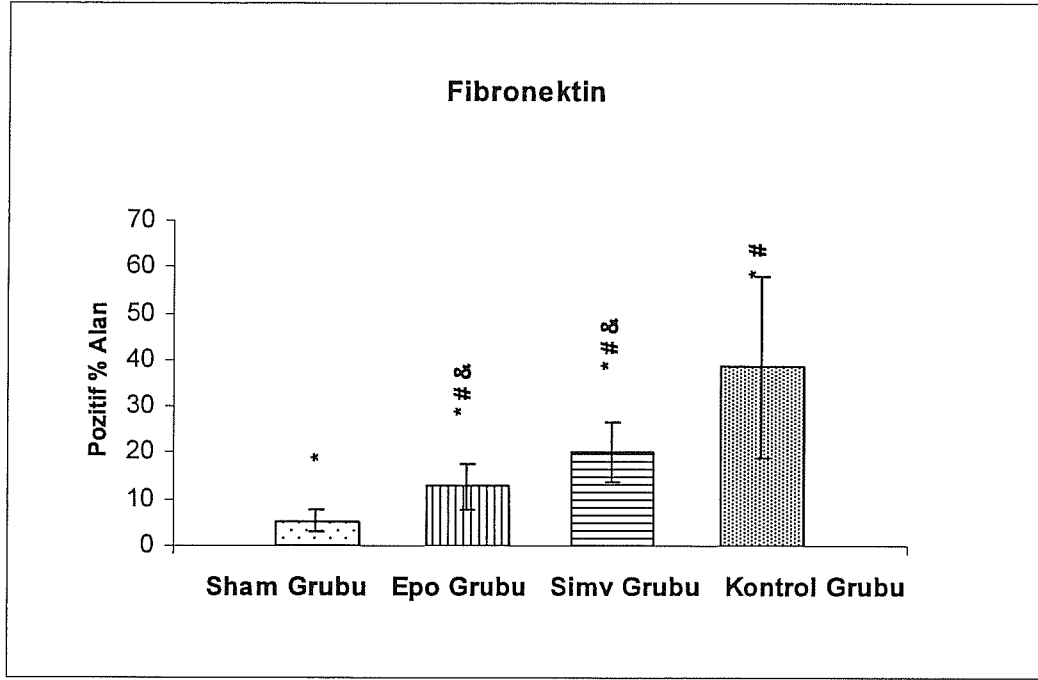
Şekil 8. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin PDGF B ekspresyonu üzerine olan etkileri. * $p < 0.01$ Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubunun sham grubu ile karşılaştırılmaları.

Sham grubunda bFGF doku ekspresyonu; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p < 0.01$). Eritropoetin grubunda bFGF ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p < 0.01$). Simv grubunda ise bFGF ekspresyonu kontrol grubuna göre daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi. *Basic fibroblast growth factor* ekspresyonu Epo grubunda Simv grubuna göre daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi (Şekil 9).



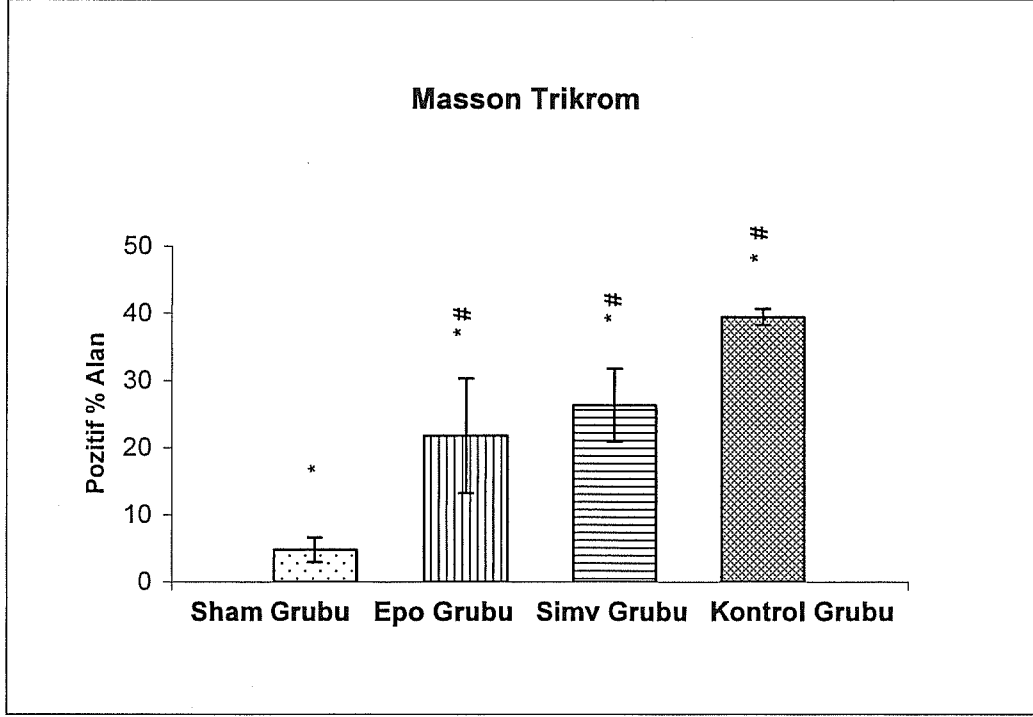
Şekil 9. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin bFGF ekspresyonu üzerine olan etkileri. * $p < 0.01$ Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubunun sham grubu ile karşılaştırılmaları. # $p < 0.01$ Epo grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılması.

Sham grubunda fibronektin doku ekspresyonu; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p < 0.01$). Eritropoetin grubu ve Simv grubunda fibronektin ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p < 0.01$). Ayrıca fibronektin ekspresyonu Epo grubunda Simv grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı daha düşük bulundu (Şekil 10).



Şekil 10. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin fibronektin ekspresyonu üzerine olan etkileri. * $p < 0.01$ Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubunun sham grubu ile karşılaştırılmaları. # $p < 0.01$ Epo grubu ve Simv grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılmaları. & $p < 0.01$ Epo grubunun Simv grubu ile karşılaştırılması.

Sham grubunda Masson trikrom ile boyalı alan; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha az bulundu ($p < 0.01$). Eritropoetin ve Simv grubunda Masson trikrom ile boyalı alanın kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az olduğu görüldü ($p < 0.01$). Ancak Masson trikrom boyalı alan Simv grubuna göre Epo grubunda daha az olmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü (Şekil 11).



Şekil 11. Obstrüktif nefropatide eritropoetin ve simvastatin tedavilerinin interstisiyel fibrozisi gösteren Masson trikrom boyalı alan üzerine olan etkileri. * $p < 0.01$ Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubunun sham grubu ile karşılaştırılmaları. # $p < 0.01$ Epo grubu ve Simv grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılmaları.

5-TARTIŞMA

Progresif interstisiyel fibrozis, tüm kronik böbrek hastalıklarında olduğu gibi ON'nin de en dramatik sonucudur. Deneysel çalışmalarda, TÜO uygulanmış ratlarda obstrüksiyon düzeltildikten 28 gün sonra aynı taraf böbrekte GFH'nin normale döndüğü ancak interstisiyel fibrozis gelişmesinin devam ettiği görülmüş. Bir yıl sonraki takiplerinde ise GFH'nin azaldığı, proteinürinin arttığı ve sağlam olan karşı taraf böbrekte de gomerüloskleroz, tübüler atrofi, makrofaj infiltrasyonu ve interstisiyel fibrozisin belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (3, 4). Bu nedenle ON'de böbrek hasarlanmasını ve KRY gelişmesini önlemek için cerrahi düzeltmenin yanı sıra fibrozisi önlemek için çeşitli ajanlar denenmiştir. Renal fibrozis patogenezinde rolü olan profibrotik ajanlar fibrozisin önlenmesinde tedavi hedefleridir (5). Fibrozisi önlemede en etkili tedavi hedefini ve bu hedefi en etkili inhibe eden ajanı belirleyebilmek için antifibrotik ajanların etkilediği mekanizmalarının araştırılması ve bu etkilerin karşılaştırılması oldukça önemlidir.

Bizim çalışmamızda statinlerden Simv ve hematopoetik bir faktör olan Epo'nin ON'de fibrozisi önleyici etkileri; NFkB, TGF- β , PDGF B, bFGF, fibronektin ekspresyonu ve Masson trikrom boya ile gösterilen intersitisiyel fibrozis üzerine olan etkileri karşılaştırılmıştır. Bu çalışma Simv ve Epo tedavilerinin ON'de fibrozis üzerine olan etkilerinin karşılaştırıldığı ve ON'de Simv'in NFkB ve PDGF B üzerine olan etkisinin, Epo'in ise NFkB, PDGF B ve bFGF üzerine olan etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Daha önce Vieira ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Simv'nin TÜO oluşturulmuş ratlarda kollajen 1, kollajen 3, fibronektin, MCP-1, TGF- β , bFGF, PCNA, vimentin ve α -SMA ekspresyonu, makrofaj infiltrasyonu ve lenfosit infiltrasyonu üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir (8). Bu çalışmada Simv'nin kontrol grubuna göre bFGF ve PCNA'da değişiklik yapmamakla birlikte kollajen 1, kollajen 3, fibronektin, MCP-1, TGF- β , vimentin ve α -SMA'yı azaltarak fibrozisi azalttığı gösterilmiştir. Eritropoetin ve Epo'nin noneritropoetin türevinin de önceki çalışmalarda ON'de tübüler hasarı ve fibrozisi azaltmadaki etkinlikleri araştırılmıştır (12, 13, 14). Eritropoetin noneritropoetin türevi kemik iliğindeki homodimer Epo reseptörlerine bağlanamayarak eritrosit sayısını arttırmayan ve dokudaki heterotrimerik reseptörlere bağlanarak etki eden *carbamyated erythropoietin* (CEPO)'dir. Park ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Epo'in TÜO oluşturulmuş ratlarda TGF- β , α -SMA ve fibronektin

ekspresyonunu azaltarak renoprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir (14). İki ayrı çalışmada ise CEPO'nin ON'de renoprotektif etkisi çalışılmıştır (12, 13). Srisavat ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Epo ve CEPO'nin kollajen, ED-pozitif hücreleri (lenfositler ve makrofajlar) ve TUNEL-pozitif hücreleri azaltırken, α -SMA-pozitif hücrelerin ve TGF- β mRNA düzeylerinin sadece CEPO ile azaldığı, Bcl-2 düzeyinin ise sadece Epo ile azaldığı gösterilmiştir.

Nuclear factor kappa B doğal bağışıklık yanıtında aktive olan ve inflamatuvar olayları başlatan en önemli sistemlerden biridir (114). Bu sistem hücrede strese neden olan büyüme faktörleri, vazoaktif ajanlar, sitokinler, bakteriyel lipopolisakaritler, mikrobiyal ve viral patojenler ve oksidatif stres gibi faktörlerle aktive olur. *Nuclear factor kappa B* aktive olduğunda inflamatuvar yanıtta rolü olan bir çok proteini kodlayan genleri düzenlenleyerek inflamasyon ve fibrozisin artmasına neden olur (115). Çeşitli dokularda; diyabetik nefropatide, travmatik beyin hasarlanmasında, myokardın iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında, peritoneal fibrozisde NFkB'nin rolü araştırılmıştır (18, 19, 20, 62). Obstrüktif nefropatide de fibrozis gelişmesinde NFkB'nin rolü araştırılmıştır. Tek taraflı üreter obstrüksiyonu yapılmış ratlarda AT1 inhibisyonun NFkB aktivitesini azaltarak fibrozis gelişmesini önlediği gösterilmiştir (116, 117). Bir başka tedavi seçeneği olarak ON'de NFkB aktivitesini baskılamak için protozom inhibitörü uygulayarak NFkB endojen inhibitörü olan I κ B düzeyini devam ettirmek denenmiş ve fibrozisin azaldığı görülmüştür (118). İki ayrı çalışmada da TÜO yapılmış ratlarda curcumin (diferuloylmethane) ve sulfosalazinin NFkB üzerine etkisi araştırılmıştır. Her iki çalışmada da ON'de NFkB'nin inhibe edilmesinin fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (110, 119). Simvastatinin, antiinflamatuvar etkisinin araştırıldığı çalışmalarda; serebral iskemide ve ateroskleroziste NFkB aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (104, 120). Simvastatinin ON'de NFkB üzerine etkisi ise çalışılmamıştır (8). Eritropoetin NFkB aktivitesini azalttığı myokardın iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında, travmatik beyin hasarlanmasında ve peritoneal fibroziste gösterilmiştir (18, 19, 20). Ancak Epo'inde ON'de NFkB aktivitesi üzerine etkisi çalışılmamıştır. Bizim çalışmamızda Simv grubunda NFkB ekspresyonu kontrol grubuna göre daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi (p:0.08). Eritropoetin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük (p<0.01) olmakla birlikte Simv grubu ve Epo grubu arasında NFkB ekspresyonu

açısından istatistiksel anlamlı fark görülmedi. Epo grubunda NFkB düzeyinin kontrol grubuna göre daha düşük olması nedeniyle Epo'nin ON'de NFkB aktivitesini baskıladığı görüldü. Bu çalışma ON'de Simv'nin NFkB ekspresyonu üzerine etkisinin araştırıldığı ve bu etkinin Epo ile karşılaştırıldığı ilk çalışmadır. Bizim çalışmamızın sonucuna göre Simv'nin ON'de fibrozisi önlemede NFkB aktivitesi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı düşünüldü. Epo'nin ise ON'de fibrozisi NFkB aktivitesini baskılayarak önlediği ve NFkB ekspresyonu üzerine Simv'den daha fazla etkili olduğu düşünüldü. Bu sonuçların başka çalışmalarla ve yöntemlerle desteklenmesi gereklidir.

Transforming growth factor-β fibrozis gelişmesinde merkezi rol oynayan bir mediyatördür ve immun sistemde oldukça karmaşık sinyal yollarında fonksiyonu vardır (7). *Transforming growth factor-β*'nin güçlü endojen immun baskılayıcı etkisi nedeni ile tam bloke edilmesi ciddi yan etkilere neden olur. Deneysel bir çalışmada TGF-β eksik farelerin multifokal inflamatuvar sendrom nedeni ile öldükleri gözlenmiştir (121). Bununla birlikte TGF-β regülasyonunun karmaşık yapısı sayesinde TGF-β'nin baskılanması ile ciddi immunolojik reaksiyonlara neden olmadan fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (7). Bu yönü ile fibrozisin önlenmesinde iyi bir tedavi hedefi olduğu gösterilmiştir. Tek taraflı üreter obstrüksiyonu oluşturulmuş ratlarda TGF-β sinyal yoluna inhibitör etki yapan Smad 7 ekspresyonunun artırılmasının fibrozisi önlediği gösterilmiştir (97) Bizim çalışmamızda Simv ve Epo'nin ON'de fibrozis üzerine etkileri değerlendirilirken TGF-β düzeyi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Simvastatinin ON'de interstisyel fibrozis üzerine olan etkilerini araştıran bir çalışmada TGF-β mRNA düzeyinin taşıyıcı gruba göre azalmadığı ancak TGF-β proteini düzeyinin Simv alan grupta kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. Buna göre Simv'nin TGF-β mRNA üretimi aşamasında değil mRNA'dan protein sentezi aşamasında etkili olduğu bulunmuştur (8). Bizim çalışmamızda da Simv'nin TGF-β düzeyini etkili olarak azalttığı gösterildi. Obstrüktif nefropatide fibrozis üzerine etkisini incelediğimiz diğer ajan Epo ile yapılan bir çalışmada TÜO oluşturulmuş farelerde TGF-β'ı inhibe ederek EMT'ü önlediği ve fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (14). Ancak Epo ve CEPO'nin ON'de fibrozis üzerine etkilerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise Epo'nin TGF-β düzeyini anlamlı azaltmadığı, CEPO'nin TGF-β'yı inhibe ettiği gösterilmiştir (12). Bizim çalışmamızda ise Epo'nin TGF-β düzeyini azaltarak fibrozisi önlediği gösterildi. Simvastatin ve Epo verilen gruplar TGF-β düzeyi açısından karşılaştırıldığında ise

aralarında anlamlı fark görülmedi. Sonuç olarak her iki ajanın da ON'de TGF- β ekspresyonunu azaltarak fibrozisi önlediği düşünüldü.

Kronik renal hasarlanma sonucu fibrozis gelişmesinde önemli rol oynayan EMT'u etkileyerek fibrozisi artıran bir diğer faktör PDGF B'dir. *Platelet derived growth factor* ailesinde A, B, C ve D olarak isimlendirilen 4 izoform vardır. Renal tübüler hasarın olduğu durumlarda artan ve fibrosis gelişmesinde rolü olan izoformlar PDGF-B ve PDGF-D'dir (91, 122). Bu profibrotik ajanlar fibroblast proliferasyonunu, fibroblastın myofibroblasta dönmesini ve EMT'u aktive ederek fibrozis oluşmasında rol oynar (91, 83, 88). Tek taraflı üreter obstrüksiyonunda PDGF reseptör blokörü uygulanmasının interstisiyel fibrozisi azalttığı görülmüştür (92). Simvastatinin ve Epo'nin antifibrotik etkilerinin araştırıldığı önceki çalışmalarda PDGF-B üzerine etkileri çalışılmamıştır. Bizim çalışmamızda ON'de tedavi hedefi olarak değeri tam ortaya konmamış olan PDGF-B düzeyi üzerine Simv ve Epo'nin etkileri araştırıldı. Çalışma sonucunda Simv ve Epo tedavilerinin TÜO oluşturulmuş ratlarda PDGF-B düzeyini azaltmakla birlikte kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farka neden olmadığı görüldü. Buna göre her iki ajanın da fibrozisi önlemede PDGF-B üzerine önemli etkilerinin olmadığı düşünüldü.

Normal böbrek dokusunda çok az eksprese olan bFGF'nin interstisiyel fibrozisin derecesi ile doğru orantılı olarak tübülointerstisiyel skar gelişiminde üretiminin arttığı gösterilmiştir (88). *Basic fibroblast growth factor* EMT'u artırarak fibrosis patogenezinde rol oynar (83). Obstrüktif nefropatide bFGF düzeyini azaltan stratejilerin fibrozisin önlenmesinde etkili olacağı düşünülmüştür. Obstrüktif nefropatide fibrosis üzerine etkileri araştırılan ajanlardan sadece Simv'nin bFGF üzerine olan etkisi çalışılmış ve Simv tedavisinin bFGF düzeyini değiştirmedeği gösterilmiştir (8). Eritropoetinin bFGF üzerine etkisi ise daha önce çalışılmamıştır. Bizim çalışmamızda da TÜO oluşturulmuş ratlarda Simv tedavisi verilen grupta bFGF düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı fark görülmedi. Ancak Epo verilen grupta bFGF düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı görüldü. Bu çalışma ile Epo'nin ON'de fibrozisi önlemede bFGF ekspresyonunu azaltmasının da rolü olduğu düşünüldü. Obstrüktif nefropati patogenezinde ve fibrozisin önlenmesinde tedavi hedefi olarak bFGF'nin değerini gösteren başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi gelişmesi tüm KBH'larında olduğu gibi ON'nin de en önemli yapısal sonucudur. Ayrıca interstisyel fibrozis derecesi de organ yetmezliğinin en önemli prognostik göstergesidir (83). Tubulointerstisyel alanda biriken fibronektin ve Masson trikrom ile boyanma interstisyel fibrozisin göstergelerindedir. Bizim çalışmamızda TÜO yapılan ratlarda Simv ve Epo tedavilerinin fibrozis üzerine etkilerini değerlendirirken interstisyel fibrozis derecesini belirlemek için böbrek dokusundaki fibronektin ekspresyonu ve Masson trikrom ile boyanma kullanıldı. Çalışmamızda tübülointerstisyel alanda fibronektin birikimi ve Masson trikrom ile boyanma düzeyi hem Epo grubu hem de Simv grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı düşük bulundu. Bu sonuç daha önce Epo ve Simv'nin ON'de renal fibrozis üzerine etkilerini araştıran çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (8, 14). Buna göre hem Simv hem de Epo ON'de fibrozisi etkili olarak önlemektedir. Buna ek olarak bizim çalışmamızda grup Epo'de fibronektin düzeyinin grup Simv'e göre istatistiksel anlamlı daha düşük, Masson trikrom ile boyanmanın da de istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte daha düşük olduğu görüldü. Bu sonuca göre Epo'nin ON'de antifibrotik etkisinin Simv'den daha fazla olduğu düşünüldü. Eritropoietinin ON'de interstisyel fibrozis gelişmesini Simv'e göre daha fazla azaltmasının profibrotik faktörlerden NFkB'yi ve bFGF'yi daha etkili inhibe etmesine bağlı olabileceği düşünüldü. Bu çalışmanın sonucuna göre ON'de fibrozisi önlemek için EPO'nin Simv'den daha uygun bir ajan olduğu düşünüldü.

Sonuç olarak ON'de fibrozis patogenezinin aydınlatılması ve fibrozisin önlenmesinde tedavi hedefleri ve uygun tedavi edici ajanların belirlenmesi için çalışmalar devam etmektedir. Simvastatin ve Epo'nin çeşitli dokularda fibrozis gelişmesini azalttığı önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışma Simv ve Epo'nin antifibrotik etkinliğinin karşılaştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamızın sonucuna göre Epo'nin ON'de profibrotik faktörlerden NFkB ve bFGF ekspresyonunu Simv'e göre daha etkili baskılayarak fibrozisi daha fazla önlediği görüldü. Buna göre ON'de fibrozisi önlemek için EPO'nin Simv'den daha uygun bir ajan olabileceği düşünüldü. Bu sonucun diğer deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

SONUÇLAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji Bilim Dalı tarafından Patoloji ve Üroloji Anabilim Dallarının katkıları ile yapılan ve TÜO oluşturulan ratlarda Epo ve Simv tedavilerinin ON'de fibrozis üzerine etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- 1- Sham grubunda morfolojik olarak tübül yapılarının ve tübülointerstisiyel alanın normal olduğu ve TGF- β , NFkB, PDGF B, bFGF ve fibronektin immunohistokimyasal boyanmasında hafif yoğunlukta boyanma olduğu görüldü (Resim 15).
- 2- Eritropoetin grubu, Simv grubu ve kontrol grubunda proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon, tübüler atrofi ve tübülointerstisiyel alanda fibröz genişleme olduğu, glomerül yapılarının ise korunduğu görüldü (Resim 15).
- 3- Sham grubunda TGF- β doku ekspresyonu; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.01$) (Tablo IV) (Şekil 6).
- 4- Eritropoetin grubu ve Simv grubunda kontrol grubuna göre TGF- β ekspresyonu anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.01$) (Tablo 4) (Şekil 6).
- 5- *Transforming growth factor- β* ekspresyonu açısından Epo grubu ve Simv grubu arasında anlamlı fark görülmedi (Tablo 4) (Şekil 6).
- 6- Sham grubunda NFkB doku ekspresyonu; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.01$) (Tablo 4) (Şekil 7).
- 7- Eritropoetin grubunda NFkB ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p<0.01$) (Tablo 4) (Şekil).
- 8- Simvastatin grubunda NFkB ekspresyonu kontrol grubuna göre daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi (Tablo 4) (Şekil 7).
- 9- *Nuclear factor kappa B* ekspresyonu Epo grubunda Simv grubuna göre daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi (Tablo 4) (Şekil 7).
- 10- Sham grubunda PDGF B doku ekspresyonu; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.01$) (Tablo 4) (Şekil 8).

- 11- Eritropoetin grubu ve Simv grubunda PDGF B ekspresyonu kontrol grubuna göre daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi (Tablo 4) (Şekil 8).
- 12- Sham grubunda bFGF doku ekspresyonu; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.01$).
- 13- Eritropoetin grubunda bFGF ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.01$) (Tablo 4) (Şekil 9).
- 14- Simvastatin grubunda bFGF ekspresyonu kontrol grubuna göre daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi (Tablo 4) (Şekil 9).
- 15- *Basic fibroblast growth factor* ekspresyonu Epo grubunda Simv grubuna göre daha düşük bulunmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi (Tablo 4) (Şekil 9).
- 16- Sham grubunda fibronektin doku ekspresyonu; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.01$) (Tablo 4) (Şekil 10).
- 17- Eritropoetin grubu ve Simv grubunda fibronektin ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü ($p<0.01$) (Tablo 4) (Şekil 10).
- 18- Fibronektin ekspresyonu Epo grubunda Simv grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı daha düşük bulundu (Tablo 4) (Şekil 10).
- 19- Sham grubunda Masson trikrom ile boyalı alan; Epo grubu, Simv grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha az bulundu ($p<0.01$) (Tablo 4) (Şekil 11).
- 20- Eritropoetin ve Simv grubunda Masson trikrom ile boyalı alanın kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az olduğu görüldü ($p<0.01$) (Tablo 4) (Şekil 10).
- 21- Masson trikrom boyalı alan Simv grubuna göre Epo grubunda daha az olmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü (Tablo 4) (Şekil 11).

KAYNAKLAR

- 1- Seikaly MG et al. Chronic renal insufficiency in children: the 2001 annual report of the NAPRTCS. *Pediatr Nephrol* 2003;18: 796–804.
- 2- Bek K, Akman S, Bilge I, Topalođlu R, alıřkan S, Peru H, Cengiz N, Söylemezođlu O. Chronic kidney disease in children in Turkey. *Pediatr Nephrol* DOI 10.1007/s00467-008-0998-4
- 3-. Chevalier RL, Thornhill BA, Chang AY. Unilateral ureteral obstruction in neonatal rats leads to renal insufficiency in adulthood. *Kidney Int* 2000; 58:1987-1995.
4. Chevalier RL, Kim A, Thornhill BA, et al. Recovery following relief of unilateral ureteral obstruction in the neonatal rat. *Kidney Int* 1999;55:793-807.
- 5- Boor P, Sebekova K, Ostendorf T, Floege J. Treatment targets in renal fibrosis *Nephrol Dial Transplant* 2007; 1-17.
- 6- Chevalier RL. Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nature Clinical Practice Nephrology* 2006; 3: 157-168.
- 7- Nangaku M. Mechanisms of túbulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern Med* 2004; 43: 9–17.
- 8- Vieira JM, Mantovani E, Rodrigues LT, Delle H, Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. Simvastatin attenuates renal inflammation, túbular transdifferentiation and interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1582–1591.
- 9- Banes-Berceli AK, Shaw S, Ma G, Brands M, Eaton DC, Stern DM, Fulton D, RW Caldwell, Marrero MB. Effect of simvastatin on high glucose- and angiotensin II-induced activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291: F116–F121.
- 10- Henrich D, Seebach C, Wilhelm K, Marzi I. High Dosage of Simvastatin Reduces TNF- α -Induced Apoptosis of Endothelial Progenitor Cells but Fails to Prevent Apoptosis Induced by IL-1 β In Vitro. *Journal of Surgical Research* 2007; **142**: 13–19.
- 11- Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Simvastatin Potentiates TNF- α -Induced Apoptosis through the Down-Regulation of NF κ B-Dependent Antiapoptotic Gene Products: Role of I κ B α Kinase and TGF- β -Activated Kinase-1 *The Journal of Immunology* 2007; 178: 2507-2516.

- 12- Srisawat N, Manotham K, Eiam-Ong S, Katavetin P, Praditpornsilpa K, Eiam-Ong S. Erythropoietin and its non-erythropoietic derivative: Do they ameliorate renal tubulointerstitial injury in ureteral obstruction? *International Journal of Urology* 2008; 15: 1011–1017.
- 13- Kitamura H, Isaka Y, Takabatake Y, Imamura R, Suzuki C, Takahara S, Imai E. Nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects against tubulointerstitial injury in a unilateral ureteral obstruction model. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 1521–1528.
- 14- Park SH, Choi MJ, Song IK, Choi SY, Nam JO, Kim CD, Lee BH, Park RW, Park KM, Kim YJ, Kim IS, Kwon TH, Kim YL. Erythropoietin Decreases Renal Fibrosis in Mice with Ureteral Obstruction: Role of Inhibiting TGF- β -Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1497–1507.
- 15- Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(2):348–55.
- 16- Efthimiadou A, Pagonopoulou O, Lambropoulou M, Papadopoulos N, Nikolettos NK. Erythropoietin enhances angiogenesis in an experimental cyclosporine A-induced nephrotoxicity model in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34(9): 866-9.
- 17- Lee SH, Li C, Lim SW, Ahn KO, Choi BS, Kim YS, Moon IS, Kim J, Bang BK, Yang CW. Attenuation of interstitial inflammation and fibrosis by recombinant human erythropoietin in chronic cyclosporine nephropathy. *American Journal of Nephrology* 2005; 25(1):64–76.
- 18- Mondello S, Emanuela Mazzon E, Paola RD, Crisafulli C, Italiano D, Buemi M, Aloisi C, Cuzzocrea S. Erythropoietin suppresses peritoneal fibrosis in rat experimental model. *European Journal of Pharmacology* 2009; 604: 138–149.
- 19- Chen, G., Shi, J.X., Hang, C.H., Xie, W., Liu, J., Liu, X. Inhibitory effect on cerebral inflammatory agents that accompany traumatic brain injury in a rat model: a potential neuroprotective mechanism of recombinant human erythropoietin (rhEPO). *Neurosci. Lett* 2007; 425: 177–182.
- 20- Xu, B., Dong, G.H., Liu, H., Wang, Y.Q., Wu, H.W., Jing, H. Recombinant human erythropoietin pretreatment attenuates myocardial infarct size: a possible mechanism

- involves heat shock Protein 70 and attenuation of nuclear factor kappa B. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2005; 35: 161–168.
- 21- K peli S, K peli B.  riner obstruksiyonlar. Anafarta K, Bed k Y, Arıkan N. *Temel  roloji*. 3. baskı. G neş Kitapevi, 2007; 283-301.
- 22- Bell ET. *Renal Disease*. Philadelphia, Lea &Febiger, 1946.
- 23- Campbell MR. Urinary Obstruction, in: MF. Campbell and J.H. Harrison (eds.), *Urology*, Vol. I (3rd ed.). Philadelphia, Saunders, 1970.
- 24- Chen F. Genetic and developmental basis for urinary tract obstruction. *Pediatr Nephrol* DOI 10.1007/s00467-008-1072-y
- 25- Lebowitz RL. Neonatal hydronephrosis: 146 cases. *Radiol Clin North Am* 1977; 15:49-59.
- 26- Flashner SC. Ureteropelvic junction. In: Kelalis PP, King LR, Belman AB, eds. *Clinical pediatric urology*. Philadelphia: Saunders, 1992:693-725.
27. Kelalis PP, Culp OS, Stickler GB, et al. Ureteropelvic obstruction in children: experiences with 109 cases. *J Urol* 1971; 106:418-422.
28. Johnston JH, Evans JP, Glassberg KI, et al. Pelvic hydronephrosis in children: a review of 219 personal cases. *J Urol* 1977; 117:97-101.
- 29- Koff SA, Campbell KD. The nonoperative management of unilateral neonatal hydronephrosis: natural history of poorly functioning kidneys. *J Urol* 1994;152:593-595.
- 30- Brown T, Mandell J, Lebowitz RL. Neonatal hydronephrosis in the era of sonography. *Am J Radiol* 1992; 148:959-963.
- 31- Merlet-Benichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, et al. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatr Nephrol* 1994; 8:175-180.
32. Chung KH, Chevalier RL. Arrested development of the neonatal kidney following chronic ureteral obstruction. *J Urol* 1996; 155:1139-1144.
- 33- Chevalier RL, Chung KH, Smith CD, et al. Renal apoptosis and clusterin following ureteral obstruction: the role of maturation. *J Urol* 1996; 156:1474-1479.
- 34- Nguyen HT, Thomson AA, Kogan BA, et al. Expression of the Wnt gene family during late nephrogenesis and complete ureteral obstruction. *Lab Invest* 1999; 79:647-658.

- 35- Haralambous-Gasser A, Chan D, Walker RG, et al. Collagen studies in newborn rat kidneys with incomplete ureteric obstruction. *Kidney Int* 1993; 44:593-605.
- 36- Gasser B, Mauss Y, Ghnassia JP, et al. A quantitative study of normal nephrogenesis in the human fetus: its implication in the natural history of kidney changes due to low obstructive uropathies. *Fetal Diagn Ther* 1993; 8:371-384.
- 37- Eskild-Jensen A, Frokiaer J, Djurhuus JC, et al. Reduced number of glomeruli in kidneys with neonatally induced partial ureteropelvic obstruction in pigs. *J Urol* 2002;167:1435-1439.
- 38- Josephson S. Experimental obstructive hydronephrosis in newborn rats. III. Long-term effects on renal function. *J Urol* 1983; 129:396-400.
- 39- Chevalier RL, Thornhill BA, Chang AY, et al. Recovery from release of ureteral obstruction in the rat: relationship to nephrogenesis. *Kidney Int* 2002; 61:2033-2043.
- 40- Shibata S, Shigeta M, Shu Y, et al. Initial pathological events in renal dysplasia with urinary tract obstruction in utero. *Virchows Arch Int J Pathol* 2001; 439:560-570.
- 41- El-Dahr SS, Gomez RA, Gray MS, et al. In situ localization of renin and its mRNA in neonatal ureteral obstruction. *Am J Physiol* 1990; 258:F854-F862.
- 42- Lopez MLSS, Pentz ES, Robert B, et al. Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281:F345-F356.
- 43- Fogo A, Ichikawa I. Angiogenic action of angiotensin II is important for the glomerular growth of maturing kidneys. *Kidney Int* 1991; 39:S37-S38.
- 44- Hilgers KF, Nagaraj SK, Karginova EA, et al. Molecular cloning of KS, a novel rat gene expressed exclusively in the kidney. *Kidney Int* 1998; 54:1444-1454.
- 45- Chevalier RL, Goyal S, Wolstenholme JT, et al. Obstructive nephropathy in the neonate is attenuated by epidermal growth factor. *Kidney Int* 1998; 54:38-47.
- 46- Chevalier R.L. Molecular and cellular pathophysiology of obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol* 1999; 13:612-619
- 47- Chevalier RL and Cachat F (2001) Role of angiotensin II in chronic ureteral obstruction. In *The Renin-Angiotensin System and Progression of Renal Diseases*, 250-260 (Ed. Wolf G) Basel: Karger
- 48- Ichikawa I et al. Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT. *Kidney Int* 2002; 61: 889-898

- 49- Tufro-McReddie A, Romano LM, Harris JM, et al. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am J Physiol* 1995; 269:F110-F115.
- 50- Chevalier RL, Thornhill BA, Wolstenholme JT. Renal cellular response to ureteral obstruction: role of maturation and angiotensin II. *Am J Physiol* 1999; 277:F41-F47.
- 51- Schreiner GF, Harris KPG, Purkerson ML, et al. Immunological aspects of acute ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the kidney. *Kidney Int* 1991; 34:487-493.
- 52- Lange-Sperandio B, Cachat F, Thornhill BA, et al. Selectins mediate macrophage infiltration in obstructive nephropathy in newborn mice. *Kidney Int* 2002; 61:516-524.
- 53- Grandaliano G, Gesualdo L, Bartoli F, et al. MCP-1 and EGF renal expression and urine excretion in human congenital obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2000; 58:182-192.
- 54- Kitagawa K et al. Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol* 2004; 165: 237–246
- 55- Lange-Sperandio B et al. Selectins mediate macrophage infiltration in obstructive nephropathy in newborn mice. *Kidney Int* 2002; 61: 516–524
- 56- Takeda A et al. Role of leukocyte adhesion molecules in monocyte/macrophage infiltration in weanling rats with unilateral ureteral obstruction. *Int J Urol* 2000; 7: 415–420
- 57- Lange-Sperandio B et al.: Distinct roles of Mac-1 and its counter-receptors in neonatal obstructive nephropathy. *Kidney Int*, in pres
- 58- Cheng QL et al. Effects of ICAM-1 antisense oligonucleotide on the tubulointerstitium in mice with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2000; 57: 183–190
- 59- Yamagishi H et al. Genetically modified bone marrow-derived vehicle cells site specifically deliver an anti-inflammatory cytokine to inflamed interstitium of obstructive nephropathy. *J Immunol* 2001;166: 609–616
- 60- Morrissey JJ and Klahr S Enalapril decreases nuclear factor κ B activation in the kidney with ureteral obstruction. *Kidney Int* 1997; 52: 926–933
- 61- Klahr S and Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F861–F875
- 62- Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y, Henger A, Brunner B, Eichinger F, Nitsche A, Kiss E, Bleich M, Gro"ne HJ, Nelson PJ, Schlo"ndorff D, Cohen CD, Kretzler M.

- Modular Activation of Nuclear Factor- κ B Transcriptional Programs in Human Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2006; 55:2993–3003
- 63- Miyajima A et al. Novel nuclear factor κ B activation inhibitor prevents inflammatory injury in unilateral ureteral obstruction. *J Urol* 2003; 169: 1559–1563
- 64-Nagatoya K et al. Y-27632 prevents t b lointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2002; 61:1684–1695
- 65-Ophascharoensuk V et al. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int* 1999;56:571–580
- 66- Zhang G et al. Urokinase receptor modulates cellular and angiogenic responses in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1234–1253
- 67- Chevalier LR, Roth JA, Obstructive uropathy, Avner ED, Harmon WE, Niaudet P (eds). 5th Edition Pediatric Nephrology. Lippincott Williams and Wilkins 2005; 1049-1076.
- 68- Cachat F et al. Ureteral obstruction in neonatal mice elicits segment-specific t b lar cell responses leading to nephron loss. *Kidney Int* 2003; 63: 564–575
- 69- Miyajima A et al. Antibody to transforming growth factor- β ameliorates t b lar apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2000; 58:2301–2313
- 70- Power RE et al. Mechanical deformation induced apoptosis in human proximal renal t b lar epithelial cells is caspase dependent. *J Urol* 2004; 171:457–461
- 71- Morrissey JJ, Klahr S. Rapid communication. Enalapril decreases nuclear factor kappa B activation in the kidney with ureteral obstruction. *Kidney Int* 1997;52: 926-933,
- 72- Kiley SC et al. Growth factor-mediated phosphorylation of proapoptotic BAD reduces t b le cell death in vitro and in vivo. *Kidney Int* 2003; 63: 33–42
- 73- Chevalier RL et al. Chronic ureteral obstruction in the rat suppresses renal t b lar bcl-2 and stimulates apoptosis. *Exp Nephrol* 2000; 8: 115–122
- 74- Gao X et al. Hepatocyte growth factor gene therapy retards the progression of chronic obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2002; 62: 1238–1248
- 75- Miyajima A et al. Role of nitric oxide in renal t b lar apoptosis of unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2001; 59: 1290–1303
- 76- Ito K et al. Liposome-mediated transfer of nitric oxide synthase gene improves renal function in ureteral obstruction in rats. *Kidney Int* 2004; 66:1365–1375

- 77- Chevalier RL et al. Obstructive nephropathy in the neonatal rat is attenuated by epidermal growth factor. *Kidney Int* 1998; 54: 38–47
- 78- Chevalier RL et al. Renal tubulointerstitial injury from ureteral obstruction in the neonatal rat is attenuated by IGF-1. *Kidney Int* 2000; 57: 882–890
- 79- Nguyen HT et al. Heparin-binding EGF-like growth factor is up-regulated in the obstructed kidney in a cell- and region-specific manner and acts to inhibit apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 156: 889–898
- 80- Bhaskaran M et al. Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol* 2003; 284: F955–F965
- 81- Basnakian AG et al. Ceramide synthesis is essential for endonuclease-mediated death of renal tubular epithelial cells induced by hypoxiareoxygenation *Am J Physiol* 2004; 288: F308–F314
- 82- Moriyama T et al. Fluvastatin suppresses oxidative stress and fibrosis in the interstitium of mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2001; 59: 2095–2103
- 83- Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG et al. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney International*, 2002; 61: 1714–1728
- 84- 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; 9: 964–968
- 85- Fern RJ et al. Reduced angiotensinogen expression attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *J Clin Invest* 1999; 103: 39–46
- 86- Chen CO et al. Angiotensin converting enzymeinhibition worsens renal interstitial injury from unilateral ureteral obstruction in the neonatal rat. *J Am Soc Nephrol* 2005; 17:222A
- 87- Fukasawa H et al. Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8687–8692
- 88- Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B et al. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int* 2000; 57: 1521–1538

- 89- Lan HY et al. Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1535–1548
- 90- Yang J et al. Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction. *Am J Pathol* 2003; 163: 621–632
- 91- Taneda S, Hudkins KL, Topouzis S et al. Obstructive uropathy in mice and humans: potential role for PDGF-D in the progression of tubulointerstitial injury. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2544–2555
- 92- Ludewig D et al. PDGF receptor kinase blocker AG1295 attenuates interstitial fibrosis in rat kidney after unilateral obstruction. *Cell Tissue Res* 2000; 299: 97–103
- 93- Stambe C et al. The role of p38 α mitogen-activated protein kinase activation in renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 370–379
- 94- Ishidoya S et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator are up-regulated during unilateral ureteral obstruction in adult rats. *J Urol* 2002; 167: 1503–1507
- 95- Oda T et al. PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int* 2001; 60: 587–596
- 96- Yang JW et al. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest* 2002; 110: 1525–1538
- 97- Lan HY, Mu W, Tomita N et al. Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:1535–1548
- 98- Alan J Wein (eds) *Urinary Tract Obstruction and trauma*. Campbell –Walsh Urology, Vol. 2 (9th ed.). Philadelphia, Saunders, 2007
- 99- Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 115–121
- 100-. Terada Y, Inoshita S, Nakashima O et al. Lovastatin inhibits mesangial cell proliferation via p27Kip1. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2235–2243
- 101- Wilson TW, Alonso-Galicia M, Roman RJ. Effects of lipid-lowering agents in the Dahl salt-sensitive rat. *Hypertension* 1998; 31(2): 225–231

- 102- Park JK, Muller DN, Mervaala EM et al. Cerivastatin prevents angiotensin II-induced renal injury independent of blood pressure- and cholesterol-lowering effects. *Kidney Int* 2000; 58:1420–1430
- 103- Li C, Yang CW, Park JH et al. Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *Am J Physiol* 2004; 286: 46–57
- 104-. Dichtl W, Dulak J, Frick M et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:58–63
- 105- Rupe´rez M, Rodrigues-Díez R, Blanco-Colio LM, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Esteban V, Carvajal G, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M. HMG-CoA Reductase Inhibitors Decrease Angiotensin II-Induced Vascular Fibrosis Role of RhoA/ROCK and MAPK Pathways *Hypertension* 2007; 50:377-383
- 106- Jelkmann W. Biology of erythropoietin. *Clin. Invest.* 1994; 72 (Suppl. 6): S3-10.
- 107- Anagnostou A, Liu Z, Steiner M et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1994; 91: 3974–8.
- 108- Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr. Res.* 1998; 43: 40–9.
- 109- Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M. Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003; 33: 891–6.
- 110- Kuwabara N, Tamada S, Iwata T, Teramoto K, Kaneda N, Yukimura T, Nakatani T, Miura K. Attenuation of renal fibrosis by cucumin in rat obstructive nephropathy. *Urology* 2006; 67: 440–446
- 111- Zoja C, Corna D, Rottoli D et al. Effect of combining ACE inhibitor and statin in severe experimental nephropathy. *Kidney Int* 2002; 61: 1635–1645
- 112- Baak J, Oort J: Practical morphometry. In. *A Manual of Morphometry in Diagnostic Pathology*, edited by Baak J, Oort J, Berlin, Springer-Verlag, 1983; 159-187
- 113- Rangan GK, Tesch Greg H. Quantification of renal pathology by image analysis. *Nephrology* 2007; 12: 553-558.
- 114- Hatada EN, Krappmann D, Scheidereit C. NF- κ B and the innate immune response *Curr Opin Immunol* 2000; 12(1):52-8

- 115- Kuhad A, Chopra K. Attenuation of diabetic nephropathy by tocotrienol: Involvement of NF κ B signaling pathway. *Life Sciences* 2009; 84: 296–301
- 116- Nakatani T et al. Role of renin-angiotensin system and nuclear factor- κ B in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral obstruction. *Jpn J Pharmacol* 2002; 90: 361–364
- 117- Satoh M et al. Renal interstitial fibrosis is reduced in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 317–325
- 118- Tashiro K et al. Attenuation of renal fibrosis by proteasome inhibition in rat obstructive nephropathy: possible role of nuclear factor κ B. *Int J Mol Med* 2003; 12: 587–592
- 119- Demirbilek S, Emre MH, Aydın EN, Edali MN, Aksoy RT, Akın M, Gürünlüoğlu K, Tas E, Ay S, Yılmaz Z. Sulfasalazine reduces inflammatory renal injury in unilateral ureteral obstruction. *Pediatr Nephrol* 2007; 22:804–812
- 120- Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J.Cell.Mol.Med.* 2001; 5(4): 378-387
- 121- Shull MM, Ormsby I, Kier AB et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693–699
- 122- Nakagawa T, Sasahara M, Haneda M, Kataoka H, Nakagawa H, Yagi M, Kikkawa R, Hazama F. Role of PDGF B-chain and PDGF receptors in rat tubular regeneration after acute injury. *American Journal of Pathology* 1999; 155: 1689-1699