

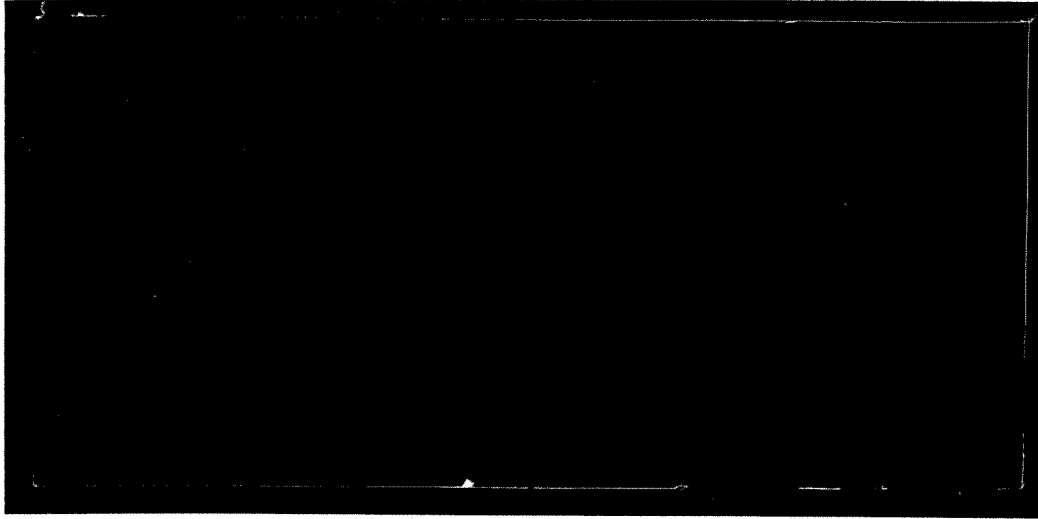
1999-215

Duy



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Committee

DENEYSEL GLOMERÜLONEFRİT
PATOGENEZİNDE NİTRİK OKSİT VE
OPOPTOZİSİN YERİ

PROJE NO: SBAG-AYD-165

DOÇ. Dr. SEZA ÖZEN
Dr. YUSUF USTA
PROF. Dr. İNCİ ŞAHİN-ERDEMLİ
YAR. DOÇ. Dr. BÜLENT GÜMÜŞEL
PROF. Dr. TURGAY DALKARA
PROF. Dr. ÜMİT SAATÇI
PROF. Dr. AYŞİN BAKKALOĞLU

EKİM 1998
ANKARA

ÖNSÖZ:

Deneysel bir nefropati modelinde nitrik oksit yapımı ve apoptozisin patogenezdaki yeri ve aralarındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmamız TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından bir alt yapı destekleme projesi olarak desteklenmiştir.

Bu çalışma için ilk başvuru önerimizde nefrotoksik serum verilerek sıçanlarda nefropati oluşturulacağı belirtilmişti. Ancak çalışma başladıktan sonra bu nefropati için amaçlanan Wiistar-Kyoto türü sıçanların temin edilememesi ve nefrotoksik serumu elde etmedeki zorluklar nedeni ile, planlanan araştırmalar doksorubisin ile nefropati oluşturulan sıçanlarda yürütülmüştür. Doksorubisin ile oluşturulan nefropati, insan idiopatik nefrotik sendromuna benzer bir nefropati oluşturmaktadır. Bu nefropati modelinde klinik bulguların doksorubisin uygulamasından sonraki 21. günde en belirgin olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda da doksorubisin verilmesinden 21. gün sonra sıçanların serum ve idrarlarında nitrit tayini, böbreklerinin histopatolojik incelemeleri, izole perfüze böbrek preparatının fenilefrin ve asetikoline verdiği yanıtlar, böbrekte apoptozis ve “proliferating cell nuclear antigen” için immünohistokimyasal boyanmalar yapılmış ve analizler tamamlanmıştır. Çalışmamızda ayrıca aminoguanidin ve pentoksifilin tedavilerinin nefropati modelinde incelenen parametrelere etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda doksorubisin nefropatisinde L-arjinin-nitrik oksit yolağının rolü ve apoptozis ile ilişkisi ile ilgili bulgular elde edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

Tablo ve Şekil Listeleri

Öz

Abstract

Giriş

Genel Bilgiler

Gereç ve Yöntem

Bulgular

Tartışma ve Sonuç

Referanslar

Tablo ve Şekiller

Tablo ve Şekil Listesi;

Tablo 1: Gruplara göre glomerüler ve tübüler hücre sayımları ile proteinüri düzeyleri

Tablo 2: TUNEL boyama yöntemi ile tübüller ve interstisyumda saptanan apoptozis ve idrar nitrit düzeyleri

Şekil 1: Kontrol (■) ve nefropati (□) sıçan gruplarından (n=6) izole edilen perfüze böbrekte fenilefrin ile elde edilen perfüzyon basınçlarındaki artışa ait konsantrasyon-cevap eğrileri. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. (*Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır, $p < 0.05$).

Şekil 2: Kontrol (■), nefropati (□), aminoguanidin tedavisi yapılan nefropati (▲) ve pentoksifilin tedavisi yapılan nefropati (Δ) sıçan gruplarından (n=6) izole perfüze böbrekte fenilefrin ile elde edilen perfüzyon basınçlarındaki artışa ait konsantrasyon-cevap eğrileri. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. (*Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır, $p < 0.05$).

Şekil 3: Kontrol (□), nefropati (□), aminoguanidin tedavisi yapılan nefropati (□) ve pentoksifilin tedavisi yapılan nefropati (■) sıçan gruplarından (n=6) izole perfüze böbrekte asetilkolin, papaverin ve sodyum nitroprusiyat (SNP)'in gerçekleştirdiği perfüzyon basıncındaki azalma cevapları. Değerler fenilefrin ile perfüzyon basıncında oluşturulan artışın yüzdesi olarak ifade edildi ve ortalama \pm standart hata olarak sunuldu. (*Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır, $p < 0.05$).

ÖZ

Nitrik oksit (NO) ve apoptozisin böbrek hastalıklarındaki rolleri ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmaktadır. Sunulan çalışmada sıçanlara 4 mg/kg (i.v.) doksorubisin uygulanarak deneysel nefropati oluşturulmuştur. Bu modelde L-arjinin-NO yolağının rolü ve böbrekte oluşan histopatolojik ve vasküler reaktivite değişiklikleri üzerine 50 mg/kg, ip, 21 gün süre ile aminoguanidin ve pentoksifilin tedavilerinin etkisi incelenmiştir. Çalışmada sıçanlardan 21. gün sonra proteinüri ve nitrit düzeyleri değerlendirmesi için idrar ve serum örnekleri alınmış ve anestezi altında böbrekleri çıkartılmıştır. Böbreklerden biri izole böbrek preparatının hazırlanmasında diğeri patolojik araştırmalar için kullanılmıştır. Apoptozis ve “proliferating cell nuclear antigen” gösterilmesi için immünohistokimyasal yöntemle boyamalar yapılmıştır.

Sıçanların proteinüri değerlerinin nefropati oluşturulan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu saptanmıştır. Histopatolojik olarak nefropati oluşturulan grupta fokal ve segmenter mezangial proliferasyon bulunmuştur. Bu grupta glomerüler hücre sayısı, aminoguanidin veya pentoksifilin tedavisi alan nefropati gruplarından, tübüler hücre sayısı ise gerek tedavi alan nefropati gruplarından gerekse kontrol gruplarından anlamlı olarak fazla bulunmuştur ($p < 0.05$). Serum nitrit düzeylerinde ve böbreklerin PCNA boyanmalarında gruplar arası fark bulunamamıştır. İdrar nitrit düzeyleri ise nefropati oluşturulan grupta, kontrol ve tedavi alan nefropati gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. İzole perfüze böbrek preparatında, fenilefrin ve asetilkoline verilen vasküler yanıtlar nefropati grubunda anlamlı olarak azalmış, aminoguanidin ve pentoksifilin tedavileri ile ise bu cevaplardaki azalmalar önlenmiştir. Ayrıca nefropati grubunda böbreklerde tübülointerstisyel bölgede apoptotik hücreler izlenmiş, kontrol ve tedavi alan gruplarda apoptozis saptanmamıştır.

Bu çalışmada tübülointerstisyel bölgedeki değişikliklerin önemi dikkat çekmiştir. Bu bulgu tübülointerstisyumun glomerulopatilerdeki önemini desteklemektedir. Doksorubisin nefropatisinde idrar nitrit düzeylerindeki belirgin artış ve perfüze böbrek preparatında gözlenen yanıtlar, bu modelde böbrekteki aşırı miktarda NO sentezini desteklemektedir. Bundan nefropatide inflamasyon ile indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)'ın indüksiyonunun sorumlu olduğu düşünülebilir. Selektif iNOS inhibitörü aminoguanidin tedavisi ile bu cevaplarda belirgin düzelme saptanmış olması da bu yorumu desteklemektedir. Bu değişikliklere paralel olarak, nefropati grubunda gözlenen apoptozisin aminoguanidin ile inhibe edilmesi apoptozisin uyarılmasında NO'nun etkinliğini desteklemektedir. Pentoksifilin tedavisinin de aminoguanidin gibi nefropatiye bağlı olarak gözlenen gerek histopatolojik değişiklikleri ve apoptotizisi gerekse idrar nitrit düzeyindeki artış ve böbrek vasküler yanıtlarındaki bozulmaları inhibe ettiği saptanmıştır. Pentoksifilin bu etkisinde de TNF- α ve /veya iNOS inhibisyonunun etkin olabileceği düşünülmüştür. NO etkinliğinin ve apoptozisin böbrek hastalıklarındaki prognozunu belirlemek için ise seri çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: doksorubisin nefropatisi, nitrik oksit, apoptozis

ABSTRACT

We have studied the role of L-arginine- nitric oxide (NO) pathway and apoptosis in an experimental nephropathy induced by doxorubicin administration at a dose of 4 mg/kg (i.v.). The effect of aminoguanidine and pentoxifylline (PTX) therapy (each at a dose of 50 mg/kg i.p. for 21 days) on the pathological findings and vascular reactivity were also analyzed. At the 21st day of doxorubicin administration serum and urine samples were collected for nitrite and protein measurements and the rats were subsequently sacrificed. One of the kidneys was used for the isolated perfused kidney and the other was used for immunohistochemical (TUNEL method for apoptosis and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a proliferative index) and histopathological studies.

Proteinuria was significantly increased in the rats with doxorubicin nephropathy when compared to controls. Histopathologically a focal segmental mesangial proliferation was seen in rats with nephropathy. In these rats the number of glomerular cells were significantly increased compared to nephropathic rats receiving treatments (either aminoguanidine or PTX) and tubular cells were significantly more than all other groups ($p < 0.05$). PCNA staining and serum nitrite levels were not different between the groups. However urine nitrite levels were significantly increased in the doxorubicin nephropathy group as compared to controls and decreased significantly in rats receiving treatment with either aminoguanidine or PTX (all $p < 0.05$). Again in the aforementioned group vascular responses to Ach and phenylephrine significantly decreased and was reversed by aminoguanidine and PTX. In parallel to these findings apoptosis was detected only in the group with doxorubicin nephropathy without treatment. TUNEL positive cells disappeared in rats receiving aminoguanidine and PTX.

An important finding in this study was the pronounced tubulointerstitial findings. This supports the importance of tubulointerstitial inflammation in the progression of glomerulopathies. In this experimental model, increased urine nitrite production and vascular reactivity responses suggests an increased NO production by the kidney which was thought to be induced by inducible NO synthase. The disappearance of apoptotic cells with aminoguanidine administration suggests that NO maybe playing a role in the initiation of apoptosis. We have also shown that PTX is effective in modulating the inflammatory response in this model through the suppression of cellular response, NO production and accompanying decrease in apoptosis. Further studies will enlighten whether increased NO production and apoptosis are effective in the prognosis of renal disease.

Key words: doxorubicin nephropathy, nitric oxide, apoptosis

GİRİŞ:

İdiopatik nefrotik sendrom primer böbrek hastalıklarının önemli bir bölümünü oluşturur. Etiopatogenezleri üzerinde yoğun araştırmalar olmakla birlikte henüz kesinlik kazanmamıştır. Böbrek hastalıklarının etiopatogenezlerini araştırmak için deney hayvanlarında çeşitli yöntemlerle insan glomerulopatilerini taklit eden böbrek lezyonları oluşturulabilmektedir. Bunlardan ‘doksorubisin ile oluşturulan nefropati’ modeli idiyopatik nefrotik sendromu çalışmak için geliştirilmiştir (1). Bu modelde, sıçana doksorubisin verilerek, fokal mezangial proliferasyon ve minimal lezyon hastalığı benzeri, ayaksı çıkıntılarda silinmelerle giden bir glomerulopati oluşturulmaktadır (1).

Nitrik oksit (NO); vasküler tonusun regülasyonundan, sinirsel iletiye, apoptozisten inflamasyona kadar çok çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik olayda rol oynayan bir mediyatördür (2, 3). NO fizyolojik koşullarda, L-arjinin amino asitinden yapısal (“constitutive”) nitrik oksit sentaz (cNOS) enzimi tarafından sentezlenmektedir (4). Böbreklerde bu şekilde oluşturulan bazal NO, glomerül mikrosirkülasyonunun regülasyonu için gereklidir (5). Öte yandan, indüklenebilir NOS (iNOS) enzimi ile sentezlenen NO’nun inflamasyonda rol oynadığı ve glomerülonefrit patogenezinde önemli yeri olduğu ileri sürülmektedir. Glomerülonefrit hücre kültürlerinde NO’nun stabil ürünü olan nitrit düzeyinin arttığı, in situ immün kompleks glomerülonefritinde ve nefrotoksik nefritte iNOS aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir (5).

İndüklenebilir NOS aktivitesi ile fazla miktarda oluşan NO’nun süperoksit anyonu ve benzeri reaktif oksijen türevleri ile etkileşimi sonucu peroksinitrit gibi toksik bileşikler oluşmaktadır (6). Bu birleşikler DNA hasarına ve apoptozisin indüklenmesine neden olmaktadır (7). İnsanlarda NO ile apoptozis ilişkisine sistemik lupus eritematosus (SLE)’un böbrek tutulumunda dikkat çekilmiştir (8). SLE de indüklenen apoptozisin, iNOS ekspresyonuyla ve p53, Bcl-2 aktivitesiyle doğru orantılı olarak arttığı gösterilmiştir. Bu da insan glomerülonefritlerinde NO-apoptozis ilişkisinin önemli rolü olabileceğine işaret etmektedir (8).

Apoptozis, istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan, programlanmış hücre ölümüdür (“programmed form of cell death”). Biyokimyasal ve morfolojik olarak nekrozdan ayrılmaktadır (9).

Glomerüler hastalıklar; proliferatif, hipersellüler olabileceği gibi, hiposellüler, sklerotik bir seyir de gösterebilir. Her iki tür glomerüler lezyonun seyrinde de apoptozisin varlığı ile ilgili kanıtlar bulunmaktadır. Mesangial hücre proliferasyonunu sınırlandıran sorumlu mekanizma bilinmemektedir. Ancak proliferasyon oluşuktan sonra apoptozisin hücre proliferasyonunu kontrol eden bir mekanizma olması nedeniyle, aşırı miktarda hücre artışı kontrol ettiği düşünülmektedir(10). Apoptozisin, ağır proliferatif glomerülonefritlerde ve nötrofillerle infiltre olmuş glomerüler yumakta daha sık olduğu not edilmiştir(10). Öte yandan, glomerülosklerozun oluşması ile apoptozis arasında yakın bir ilişki vardır.

Bu çalışmada doksorubisin uygulaması ile nefropati oluşturulan sıçanların böbreklerinde, apoptozis oluşumu ve böbrek vasküler yanıtları üzerine, L-arjinin-NO yolağının rolü araştırılmıştır. Bu amaçla Weening ve Rennke tarafından önerilen sıçan modeli uyarlanarak kullanılmıştır (1). Doksorubisin verilen sıçanlardan izole edilen böbreklerde histopatolojik değişiklikler, apoptozis, perfüze böbrek preparatında vazokonstriktör ve vazodilatör ajanlara verilen yanıtlar, ve serum ve idrar nitrit düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu parametreler üzerine iNOS inhibitörü aminoguanidin ile TNF- α ve iNOS inhibitörü pentoksifilin tedavisinin etkisi de incelenmiştir.

GENEL BİLGİLER

İdiopatik nefrotik sendrom primer böbrek hastalıklarının önemli bir bölümünü oluşturur. Bu grup altında minimal lezyon hastalığı, fokal glomerüloskleroz (FGS), diffüz mezangial proliferasyon (DMP) bulunmaktadır. Etiopatogenezleri üzerinde yoğun araştırmalar olmakla birlikte henüz kesinlik kazanmamıştır.

Deneyisel glomerülo nefrit modelleri primer böbrek hastalıklarının patogenezi ışık tutmaktadır. Deney hayvanlarında çeşitli yöntemlerle insan glomerülopatilerini taklit eden böbrek lezyonları oluşturulabilmektedir. Bunlardan doksorubisin nefropatisi, idiyopatik nefrotik sendrom modeli olarak geliştirilmiştir (1).

Doksorubisin ile oluşturulmuş nefropati modelinde, sıçan böbreklerinde, bazal membranda geçirgenliğin bozulduğu, buna bağlı olarak da proteinürinin olduğu bilinmektedir. Bu nefropatide, ayaksı çıkıntılarda değişikliklerle giden ve ışık mikroskopisinde segmental mezangial hipersellülarite görülür. Bu modelin fokal glomerülosklerozun erken dönemi olduğu gösterilmiştir. Bu modelle ilgili çalışmalarda sıçanlarda proteinürinin, histopatolojik değişikliklerin ve TNF- α yapımının 21. günde en yoğun olduğu rapor edilmiştir (1).

Nitrik Oksit:

Nitrik oksit (NO) lipofilik yapıda, biyolojik membranları diffüzyonla geçen, yarılanma ömrünün çok kısa olması nedeniyle fizyolojik koşullarda etkisini lokal olarak gösteren bir mediyatördür. Sentezi L-arjinin amino asitinin terminal guanidino azot grubu ile moleküler oksijenden, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile gerçekleşmektedir. Oluşan NO hücrelerde guanilat siklaz enziminin aktif bölümündeki demir ile bağlanarak enzimi aktive eder. Enzim aktivasyonu ile meydana gelen sGMP, NO'nun biyolojik etkilerinin çoğundan sorumludur (11).

NOS'un yapısal ("constitutive") (cNOS) ve indüklenebilir ("inducible") NOS (iNOS) olmak üzere iki izoformu vardır (12). Yapısal NOS'un nöronal ve endotelial alt-grupları tanımlanmıştır (12). Yapısal NOS, NADPH ve kalsiyum-kalmodulin sistemine bağlı olarak çalışan bir enzimdir. Endotel hücreleri, nöronlar ve trombositlerde gösterilmiştir. Uyarandan sonra kısa süre içinde ve düşük konsantrasyonda (ρ M) gerçekleşen NO sentezinden sorumlu tutulmaktadır. (5, 13, 14). Endotelial yapısal NOS intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun fizyolojik sınırlar içindeki artışına bağlı olarak aktive olan bir enzimdir. Kan akımı ve kan basıncının düzenlenmesinde, vasküler tonusun regülasyonunda rol oynayan bazal NO salınımından sorumludur (15). Nöronal yapısal NOS'un ise beyin ve omurilikte dağılım gösterdiği, periferde nonadrenerjik nonkolinerjik sinirlerde iletimden sorumlu nörotransmitter olabileceği ileri sürülmektedir (16).

İndüklenebilir NOS, bakteriyel lipopolisakaritler, sitokinler (özellikle interferon - gamma, TNF α ve IL-1), ve büyüme faktörleri ile indüklenebilen bir enzimdir (7, 16,17). İndüksiyonu sonucu NO'nun uzun süreli ve daha yüksek konsantrasyonda (μ M) salınımını sağlar. iNOS izoformu endotelde, nötrofillerde, Kupffer hücrelerinde, makrofajlarda, damar düz kasında ve kalp kasında gösterilmiştir (17). Bu izoformun damar endotelinde ve düz kasında indüksiyonunun zamana bağlı olduğu, bu indüksiyona vasküler tonusta azalma, sGMP düzeyinde artış ve vazokonstriktör ajanlara azalmış bir cevabın eşlik ettiği bildirilmektedir.

Aktive olmuş makrofajların sitotoksik etkilerinde iNOS'un indüksiyonu sonucu fazla miktarda sentezlenen NO aracılık etmektedir. NO, mitokondride fonksiyon gören ve hücre proliferasyonunda görev alan bir çok enzim ile reaksiyona girerek aktivitelerini bloke eder; böylece sitostatik ve sitosidal etki gösterir. NO, süperoksit anyonlarıyla reaksiyona girerek

peroksinitrit oluşumuna ve daha fazla doku hasarına neden olabilir(6). iNOS ile fazla miktarda NO sentezi lokal vazodilatasyon ile inflamatuvar cevabın başlamasına yardımcı olur. Sepsisin patofizyolojisinde de iNOS indüksiyonu ile NO sentezindeki artışın rolü üzerinde durulmaktadır (17).

Böbrekte hem yapısal hem de indüklenebilir NOS bulunmaktadır. Endotelial yapısal NOS, renal damarların endotel hücrelerinde yer alır. Nöronal yapısal NOS ise jukstaglomerüler apparatus'un "macula densa" kısmında gösterilmiştir. Ayrıca eferent arteriollerde her ikisinin de lokalizasyonu tanımlanmıştır. iNOS böbrek yapısında; glomerüllerde, distal ve proksimal tubüllerde, mezengial hücrelerde, endotelde gösterilmiştir (18-21). NO'nun glomerüler hemodinami üzerindeki etkisi temel olarak jukstaglomerüler apparatus'ta NOS'un yerleşimi ile ilişkilidir (22,23). Jukstaglomerüler apparatus'da hem endotelial yapısal NOS, hem de indüklenebilir NOS bulunmakla birlikte fizyolojik koşullarda nöronal yapısal NOS etkinliği hakimdir.

Glomerülonefrit Patogenezinde NO'nun Etkileri: Son yıllarda, NO'nun glomerülonefrit patogenezinde rol oynadığına dair çalışmalar yayınlanmıştır(5). Glomerülonefritlerde iNOS'un indüklenmesi ile patolojik miktarlarda NO açığa çıkmaktadır. Glomerülonefrit hücre kültürlerinde nitrit düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (5). NO'nun başlıca kaynağının makrofajlar olduğu düşünülmüşse de, in vitro çalışmalarda, sitokinlerin etkisiyle, tüm glomerül hücrelerinde iNOS'un indüklenebildiği gösterilmiştir (18-21). İmmün kompleks glomerülonefritinde ve nefrotoksik nefritte immünhistokimyasal ve PCR yöntemiyle iNOS indüksiyonu gösterilmiştir (24,25).

Glomerülonefrit patogenezinde NO' in rolü üç başlıkta toplanabilir(5).

1- NO'in sitotoksik etkisi: NO'nun sitotoksitede önemini ortaya koyan ilk gözlem, makrofajların, tümör hücrelerine sitotoksik etkisinde NO'nun rol oynadığını gösterilmiş olmasıdır. Daha sonra yapılan çalışmalarda, NO'nun bir çok hücre tipinde sitotoksik etkisi ve adezyon molekül ekspresyonunda değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (5).

NO, reaktif oksijen türevleri (süperoksit anyonu gibi) ile etkileşebilir ve daha toksik bileşiklerin (peroksinitrit gibi) oluşumuna yol açarak da sitotoksik etkisini gösterebilir. Bu birleşikler daha sonra bahsedileceği üzere apoptozisi de indüklemektedirler (5).

2- NO ile immün sistemin modülasyonu: NO'nun in vitro olarak, T-hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Sitokinler, makrofajlardan NO salınımını düzenlemektedir. Bu bulgular, NO'nun immün cevabı modüle ettiğini göstermektedir ve bu da glomerülonefritlerin patogenezinde önemli olabilmektedir (5).

3- NO'in inflamasyondaki etkileri: NO akut inflamasyonda, vasodilatör etkisi nedeniyle vasküler permeabiliteyi ve lökosit infiltrasyonunu artırır. Diğer taraftan, akut vasküler hasarda tromboz sık bir komplikasyondur (26) ve NO plateletler üzerine inhibe edici etkisi ile bu komplikasyonu azaltır. NO'nun kronik inflamasyondaki etkileri ise şu şekilde açıklanmıştır: NO, hücre proliferasyonu üzerine bilinen inhibitör etkisiyle, intrensik glomeruler hücrelerde (mezengial hücre vb.) proliferatif cevapları inhibe edebileceği ve skarlaşmayı artırıcı yönde etki edebileceği ileri sürülmüştür (27).

NOS İnhibitörleri:

L-arjinin analogları olan N^o-monometil-L-arjinin (L-NMMA), N^G-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME), N^o-nitro-L-arjinin (L-NA) ve N-iminoetil-L-ornitin (L-NIO), hem yapısal hem de indüklenebilir NOS enzimini inhibe ederler ve bu etkileri stereospesifiktir (17).

Aminoasit yapısında olmayan ancak L-arjininin guanidin grubunu içeren bileşiklerin de bu enzimi inhibe ettikleri gösterilmiştir.

Aminoguanidin nükleofilik hidrazin yapısında bir guanidin türevidir. NOS'u inhibe ettiği ve özellikle iNOS'a selektivite gösterdiği bildirilmiştir (28.).

Pentoksifilin ise klasik bir NOS inhibitörü değildir. Ancak pentoksifilin makrofaj hücre kültürlerinde iNOS enzimini inhibe ettiği bildirilmiştir (29). Pentoksifilin, endotoksin ile indüklenen TNF- α gen transkripsiyonunu inhibe ederek bu sitokin sentezini azaltan, fosfodiesteraz enzimini inhibe eden bir metilksantin türevidir (30). TNF- α 'nın apoptozisin indüksiyonundaki rolü nedeniyle pentoksifilin'in bu yolağa da etki edebileceği düşünülmüştür.

Apoptozis :

Apoptozis, istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasını kontrol eden, programlanmış hücre ölümüdür. Biyokimyasal ve morfolojik olarak nekrozdan ayrılmaktadır. Embriyogenesis, metamorphosis, endokrin kaynaklı doku atrofisi gibi durumlarda doku "turnover"ının kontrolünde apoptozis önemlidir (6,31,32). Apoptoziste morfolojik olarak, hücreler toparlanır, ve mikroviluslarını kaybeder. Aynı zamanda sitoplazma yoğunlaşır fakat ribozomların ve mitokondrilerin morfolojileri korunur, endoplazmik retikulum dilate olur ve kese şeklini alır, yüzey membranıyla birleşme eğilimindedir. Kromatin, dens kresentik bir şekil alır, nükleer membran ve nükleer fragmanlar çizgi şeklide toplanırlar. Membrana bağlı segmetlerin küme yapmasıyla hücre bölümlere ayrılır. Bu durumdaki hücre makrofaj ve komşu hücreler tarafından hemen tanınır, fagositoza ve sindirime uğratılır. İntakt hücrelerin hızlı bir fagositozu olması nedeniyle, apoptozis ile zararlı hücre içeriklerine karşı dokular korunmaktadır(6).

Son yapılan çalışmalarda NO'nun apoptotik hücre ölümünde mediyatör olabileceği ileri sürülmüştür(33).

Renal hastalıklarda apoptozis :

Gobe ve Axelsen (34), deneysel hidronefrotik sıçan modelinde, apoptozisi tübüler epitel hücrelerinin komşu hücreler tarafından fagositozu ve sindirilmesi şeklinde gözlemlemişlerdir. Schumer ve ark. (32) ise, renal iskemi sırasında distal tübüllerde apoptozis olduğunu bulmuşlardır.

Glomerülde apoptozise ise ilk defa, Harrison (35) proliferatif glomerulonefritte apoptotik cisimleri göstermesiyle dikkat çekilmiştir. Işık mikroskopunda, 68 adet proliferatif glomerulonefrit böbrek biopsisinin 38'inde, apoptotik cisimler seyrek olarak gözlemlenmiştir. Apoptozisin, ağır proliferatif glomerulonefritlerde ve nötrofillerle infiltre olmuş glomerüler yumakta daha sık olduğu not edilmiş, nötrofillerin apoptozise maruz kalan hücre tipi olduğu ileri sürülmüştür (35). Savill ve ark. (36) ise, infiltre nötrofilin apoptozise uğrayan bir hücre olduğunu morfolojik olarak göstermişlerdir.

Daha da önemli olarak, hiperplastik mesengial hücrelerin de, inflamatuvar cevabın resolüsyonu sırasında, apoptozise uğrayabileceği gösterilmiştir. Baker ve ark. (37) ve Shimizu ve ark.(38), "Thy-1.1" ile oluşturulan deneysel glomerulonefrit modelinde, onarım sırasında, proliferatif olmuş glomerül mezangial hücrelerin, apoptozisle azaltıldığını gözlemlemişlerdir.

Apoptozis ile ilgili çalışmalar şimdiye dek iki deneysel model ile yürütülmüştür. Bu çalışmalar Wistar ve Wistar-Kyoto (WKY) sıçanları ile yapılmıştır :

1. “Thy-1.1” glomerulonefriti: Reversibl deneysel glomerulonefrit modelidir (39,40). Yukarıda anlatıldığı üzere, “Thy-1.1” glomerulonefrinin onarımı ve iyileşmesi sırasında glomerüler hiperselülaritenin rezolüsyonuna aracılık eden majör mekanizma apoptozis’dir (37,38).

2. “Anti-GBM” glomerulonefriti: Progressif deneysel glomerulonefrit modelidir, ekstraglomerüler kresent oluşumuyla karakterizedir. “Anti-GBM” glomerulonefritinde skarlaşan bölge içindeki glomerüler hücrelerin apoptozis gösterdikleri izlenmiştir (41). Bu durumda fazla miktarda apoptozis fibrotik süreçte olumsuz bir rol oynamaktadır(41,42).

Böylece apoptozis inflamatuvar olayın hem rezolüsyonunda hem de fibrotik sürece gidişinde etkin görünmektedir. Glomerüler hastalıklar; proliferatif, hiperselüler olabileceği gibi, hiposelüler, sklerotik bir seyir de gösterebilir. Apoptozisin hücre proliferasyonunu kontrol eden bir mekanizma olması nedeniyle, apoptozisin aşırı miktarda hücre artışını kontrol ettiği düşünülmektedir (43). Ancak yukarıda söz edildiği üzere, glomerülosklerozun oluşması ile apoptozis arasında da ilişki gösteren deneysel modeller vardır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyle Haceteppe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi Beyin Araştırmaları Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bu çalışmadaki tüm hayvan deneyleri Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi "Hayvan Etik" kurulunca onaylanmış ve hayvan etiği protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

Bu çalışmada ağırlıkları 200-300gr arasında değişen erkek ve dişi sıçanlar kullanıldı.

Çalışmada sıçanlar "kontrol grubu" ve doksorubisin uygulanan "nefropati grubu" olmak üzere iki gruba ayrıldı. Nefropati grubuna tek doz doksorubisin (4mg/kg) serum fizyolojik içerisinde, kontrol grubunu oluşturan sıçanlara ise sadece serum fizyolojik intravenöz (iv) olarak kuyruk veninden verildi.

Deneylelerin ikinci kısmında ise kontrol ve nefropati gruplarında aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisinin etkisi incelendi. Bu amaçla serum fizyolojik (kontrol) ve doksorubisin (nefropati) uygulanan sıçanların bir alt-grubuna aminoguanidin 50 mg/kg/gün dozda, intraperitoneal (i.p.) yoldan, 21 gün süreyle verildi. Bu süre boyunca sıçanların içme sularına da 1gr/lt'de olacak şekilde aminoguanidin eklendi. Kontrol ve nefropati gruplarında bir diğer gruba da pentoksifilin 50 mg/kg/gün dozda i.p. yoldan 21 gün süreyle verildi ve içme sularına da 1gr/lt'de olacak şekilde pentoksifilin eklendi.

Çalışmada her grup 5-6 sıçandan oluşturuldu. Sıçanlar 21 günün sonunda metabolizma kafesine alınarak 24 saatlik idrarları toplandı. Toplanan idrarlarda protein değerleri kantitatif olarak hesaplandı. Ayrıca serum ve idrar örneklerinde nitrit tayini yapıldı.

Daha sonra tüm sıçanların pentobarbital sodyum (30mg/kg; i.p) anestezisi altında böbrekleri çıkartıldı. Böbreklerden biri izole perfüze böbrek preparatının hazırlanmasında, diğeri patolojik araştırmalarda kullanıldı.

İzole perfüze böbrek preparatının hazırlanması:

Anestezisi altındaki sıçanlarda orta hat insizyonu ile karına girildikten sonra yapılan diseksiyonla sol renal arterin, abdominal aortadan ayrıldığı alan yalıtıldı. Renal arter çıkımının hemen proksimalinden ve distalinden abdominal aorta bağlandı ve arada kısımda kalan abdominal aortanın ön yüzüne bir kesi yapıldı. Buradan renal arter, perfüzyon kanülü ile kateterize edildi. Böbreğin perfüze olduğunu kontrol etmek amacıyla kanülden Krebs-Henseleit Solüsyonu (KHS) verildi ve yine aynı yoldan 200 Ü/kg heparin enjekte edildi. Sol böbrek, böbrek üstü bezinden ve çevre dokulardan, yapılan diseksiyonla ayrıldı, kapsülü soyuldu ve perfüzyon sistemine yerleştirildi.

İzole edilen böbrek preparatları %95 O₂- %5 CO₂ ile gazlandırılan, 37 °C'de sabit tutulan KHS ile ortalama perfüzyon hızı 6 ml/dak olacak şekilde perfüzyon pompası (Harvard Model 1203-a) ile perfüze edildi. KHS içeriği şu şekildedir (mM): NaCl: 95, KCl: 4,7, MgSO₄ : 1.2, CaCl₂ : 2.5, KH₂PO₄: 1.2, NaHCO₃ : 25, glukoz : 11.1. Perfüzyon basıncı, sisteme Y bacağı ile bağlı "basınç transdüseri" ile ölçülerek "transducer data acquisition system" (MAY-95) aracılığı ile bilgisayara kaydedildi. Preparatlar perfüzyon sisteminde 40 dakika dinlendirildikten sonra ve bazal perfüzyon basıncı stabil hale geldikten sonra deneylere geçildi.

İzole perfüze böbrek preparatlarında, perfüzyon ortamına eklenen fenilefrin (0.1-10 µM) ile konsantrasyona bağlı perfüzyon basıncında artış cevapları saptandı ve konsantrasyon-cevap eğrileri elde edildi. Daha sonra fenilefrin'in böbrek vasküler yatağı perfüzyon basıncında sağladığı maksimum artışın %70-80'ini oluşturan konsantrasyonda (0.3-1 µM) perfüzyon

solüsyonuna eklenmesi ile perfüzyon basıncı artırıldı. Asetilkolin (0.05-0.1 µg), papaverin (2.5-5 µg) ve sodyum nitroprusiyat (2.5-5 µg)'ın izole perfüze böbrek preparatının proksimalinden bolus enjeksiyonlar şeklinde perfüzyon sistemine verilmesi ile perfüzyon basıncında oluşturdukları azalma cevapları alındı.

Fenilefrin ile perfüzyon basıncında oluşturulan artış yanıtları "mmHg" olarak verildi. Asetilkolin, papaverin ve sodyum nitroprusiyat ile perfüzyon basıncında azalma yanıtları fenilefrin ile oluşturulan artışın yüzdesi olarak ifade edildi. Bulgular metin içinde ortalama ± standart hata olarak sunuldu.

Serum ve idrar örneklerinde Nitrit tayini:

Serum ve idrar örneklerinde nitrit tayini Green ve ark. (1981)'nın tarif ettiği Griess reaksiyonu yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntemde 100 µl serum ve idrar örnekleri, 100 µl Griess reaktifi (sülfanilamid ve N1-naftiletillen diamin dihidroklorür'ün % 2.5'lük H₃PO₄'deki çözeltilerinin herbirinden 50 µl) ile 10 dakika süre ile reaksiyona sokuldu. Örnekler 550 nm dalga boyunda "microplate reader"da okundu. Örneklerdeki nitrit konsantrasyonu standart olarak sodyum nitrit (0.25-100 µM) kullanarak çizilen kalibrasyon eğrisinden saptandı ve ortalama ± standart hata olarak verildi.

Patolojik Araştırmalar:

Dokularının incelenmesinde şu yöntemler kullanılmıştır: Serum fizyolojik ile ıslatılmış taze doku materyali ikiye ayrılmıştır. Bu dokular %10'luk formaldehit ile tespit edilmiştir. Tespit edilmiş doku örneklerinden hazırlanan parafin bloklardan en fazla beş mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu örneklerde "Hematoksilen-eosin" (HE) boyası ve In situ DNA Nick End Labeling -(TUNEL) metodu uygulanmıştır. "Hematoksilen-eosin" (HE) boyası ile hazırlanmış preparatların hepsinde öncelikle histopatolojik inceleme yapılmıştır. Daha sonra tübüler hücreler x40 büyütme ile (10 saha); ve glomerüler hücreler x40 büyütme ile (20 glomerülde) sayılmıştır. Apoptozisi değerlendirmek için TUNEL metodu ile hazırlanmış preparatlarda, 10 saha x40 büyütme ile, apoptozise uğrayan hücreler sayılmıştır.

Prolifere olan hücre tayini "Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)" boyaması ile yapılmıştır. Bunun için tesbit edilen dokular kesilerek hazırlanmış ve kesitler PCNA ile immünohistokimyasal yöntemlerle boyanmıştır. Pozitif hücreler x 40 büyütmede 10 saha sayılarak saptanmıştır.

In situ DNA Nick End Labeling (TUNEL): DNA parçaları insitu olarak, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve digoxigenin-11-dUTP içeren kit ile 3' nün işaretlenmesiyle, üretici firmanın tavsiyelerine uyularak saptandı (ApopTagR; Oncor; Inc.). Kısaca, formalinle sabitleştirilmiş ve parafinlenmiş 5 mikronluk doku kesitleri deparafinize ve dehidrate edildi. Nükleer proteinler, proteinase K ile 30 dakika inkübe edilerek DNA'dan ayrılması sağlandı ve endojen peroksidaz, hidrojen peroksit ile bloke edildi. Kesitler "TdT ve dUTP ile işaretlenmiş digoxigenin" içeren tampon ile inkübe edildikten sonra "digoxigenin peroxydase" işlemi ile konjuge edildi. Kromojen olarak diaminobenzidin (DAB) kullanıldı ve zemin "methyl green" ile işaretlendi. Her deneye pozitif ve negatif kontroller dahil edildi. Değerlendirmede kahverengi boyanmış TUNEL pozitif apoptotik hücreler iki araştırmacı tarafından sayıldı. Apoptotik hücreler kromotin kondansasyonlarının değişik tipte olmasıyla ayırt edildiler (perinükleer ring formasyonu, peçler, apoptotik cisimler). Sitoplazması diffüz

olarak boyanan hücreler nekroz olarak değerlendirildi ve sayılmadı. Pozitif hücreler x 40 büyütmede 10 saha sayılarak saptanmıştır.

İmmünohistolojik incelemelerde (PCNA ve TUNEL metodları) kullanılan yöntemin pahalı ve kullanılan materyalin kısıtlı olması nedeniyle bu incelemelere aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisi yapılan kontrol grubu, alınmamıştır.

Patolojik araştırmalarda elde edilen hücre sayımları metin içinde ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur.

İstatistiksel değerlendirme:

Sonuçların istatistiksel analizinde; gruplar arasındaki çok yönlü karşılaştırmalar ANOVA varyans analizi testi ile ve sonrasında Tukey HSD testi ile yapıldı. Korelasyon analizi Spearman's korelasyon testi ile yapıldı.

P değerinin 0.05'den küçük olduğu durumlarda iki ortalama arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi.

BULGULAR:

Klinik değerlendirme:

Proteinüri: Kontrol grubunda idrar protein değerleri 131.25 ± 28.67 mg/gün iken , doksorubisin ile nefropati oluşturulan sıçanlarda proteinürinin arttığı (355 ± 34.20 mg/gün) ve kontrol grubundan istatistiksel olarak daha fazla olduğu bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 1).

Aminoguanidin ve pentoksifilin tedavileri yapılan kontrol grubunda proteinüri değerleri, tedavi yapılmayan kontrol grubundan farklı bulunmadı. Diğer taraftan aminoguanidin ve pentoksifilin tedavileri, nefropati grubunda görülen proteinüri artışını önledi ve bu gruplarda da proteinüri kontrol grubundaki düzeyden farklı bulunmadı (Tablo 1).

Histopatolojik Bulgular (Işık Mikroskopisi):

Hematoksilen-

Eozin'le boyanmış preparatlarda glomerüller ve tübüler değişiklikler ayrı ayrı değerlendirildi. Işık mikroskopisinde doksorubisin nefropatisi oluşan sıçanlarda fokal ve segmenter mezangial hipersellülerite ve tübülointerstisyumda hafif hücre infiltrasyonu bulundu. Aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisi alan nefropati gruplarında bu değişikliklerde azalma izlendi.

Tüm gruplarda gereç ve yöntem bölümünde belirtildiği üzere, glomerüller ve tübüler hücreler ayrı ayrı sayıldı. Çalışma materyaline ait HE kesitlerin ışık mikroskopik incelemesi sonucunda glomerüller hücre sayıları kontrol grubunda 76.80 ± 3.11 hücre; aminoguanidin tedavisi alan kontrol grubunda 76.00 ± 5.60 hücre; pentoksifilin tedavisi alan kontrol grubunda 73.80 ± 4.94 hücre; doksorubisin nefropatisi grubunda 86.10 ± 5.33 hücre; aminoguanidin tedavisi alan nefropati grubunda 73.20 ± 1.37 hücre; pentoksifilin tedavisi alan nefropati grubunda 68.80 ± 2.15 hücre olarak bulundu. Her ne kadar doksorubisin uygulanan nefropati grubunda histolojik olarak glomerüllerde segmental-fokal mezengial hipersellülerite şeklinde, hücre sayısı artışı saptanmış ise de bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 1). Aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisi yapılan kontrol ve nefropati gruplarında, glomerüller hücre sayılarında, tedavi yapılmayan kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Yine nefropati grubunu oluşturan sıçanların böbreklerinde, tübülointerstisyumda tübüler ve interstisyel hücre artımları dikkat çekti. Tübüler hücre sayıları kontrol grubunda 771.60 ± 4.19 ; aminoguanidin tedavisi yapılan kontrol grubunda 778.00 ± 18.11 ; pentoksifilin tedavisi yapılan kontrol grubunda 906.20 ± 20.92 ; doksorubisin nefropati grubunda 1117.80 ± 48.76 ; aminoguanidin tedavisi yapılan nefropati grubunda 899.50 ± 8.95 ; pentoksifilin tedavisi yapılan nefropati grubunda 945.50 ± 8.76 olarak bulundu. Gruplar arası çok yönlü karşılaştırmalar yapıldığında tübüler hücre sayılarının tedavi yapılmayan nefropati grubunda, kontrol, aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisi yapılan kontrol ve nefropati gruplarından istatistiksel anlamlı olarak daha fazla olduğu ($P < 0.05$) görüldü.

İzole perfüze sıçan böbreği:

Kontrol ve doksorubisin uygulanan nefropati gruplarından izole edilen perfüze böbrek preparatında perfüzyon ortamına eklenen fenilefrin (0.1-10 µM) konsantrasyona bağımlı bir şekilde perfüzyon basıncını arttırdı. Her iki grup karşılaştırıldığında, fenilefrin'in gerçekleştirdiği perfüzyon basıncında artış cevabının nefropati grubunda kontrol gruba göre anlamlı olarak daha az olduğu saptandı ($p<0.05$) (Şekil 1).

Aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisi yapılan kontrol gruplarında, fenilefrine verilen perfüzyon basıncındaki artış cevabı tedavi yapılmayan kontrol grubundan farklı bulunmadı ($p>0.05$). Nefropati grubunda ise aminoguanidin ve pentoksifilin tedavileri, fenilefrin'in tüm konsantrasyonlarındaki azalmış cevabını artırarak ($p<0.05$) kontrol grubunda gözlenen düzeye çıkardı (Şekil 2).

Kontrol grubunda asetilkolin (0.05-0.1 µg), papaverin (2.5-5 µg), sodyum nitroprusiyat (2.5-5 µg) doza bağımlı olarak perfüzyon basıncını düşürdü. Nefropati grubunda asetilkolin (0.05-0.1 µg) ile elde edilen perfüzyon basıncındaki düşme cevabının kontrol grubundan anlamlı olarak daha az olduğu gözlenirken ($p<0.05$), papaverin ve sodyum nitroprusiyat cevaplarında kontrol grubundan anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$) (Şekil 3).

Aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisi uygulanan kontrol gruplarında asetilkolin (0.05-0.1 µg), papaverin (2.5-5 µg) ve sodyum nitroprusiyat (2.5-5 µg) ile elde edilen perfüzyon basıncındaki düşme cevapları, tedavi yapılmayan kontrol grubundan anlamlı olarak farklı bulunmadı ($p>0.05$). Nefropati grubunda ise aminoguanidin ve pentoksifilin tedavileri, asetilkolin (0.05-0.1 µg)'e verilen azalmış cevabı istatistiksel anlamlı olarak arttırdı ($p<0.05$). Ayrıca, pentoksifilin tedavisi yapılan nefropati grubunda asetilkolin cevabı, kontrol grubundan da daha fazla bulundu. Nefropati grubunda aminoguanidin ve pentoksifilin uygulamaları papaverin ve sodyum nitroprusiyat cevaplarını değiştirmediler ($p>0.05$) (Şekil 3).

Serum ve idrar örneklerinde nitrit düzeyleri:

Kontrol grubundan alınan serum örneklerinde nitrit düzeyi 9.45 ± 5.13 µM, doksorubisin uygulaması ile nefropati oluşturulan grupta ise 12.99 ± 5.35 µM olarak saptandı ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

İdrar örneklerindeki nitrit düzeyleri değerlendirildiğinde, nefropati grubunda idrar nitrit düzeyinin kontrol grubundaki düzeyden anlamlı olarak artmış olduğu bulundu ($p<0.05$) (Tablo 2). Aminoguanidin ve pentoksifilin tedavileri nefropati grubunda idrar nitrit düzeyinde görülen artışı azalttılar ancak kontrol grubunda gözlenen düzeye düşürmediler (Tablo 2).

Apoptozisin değerlendirilmesi:

In situ "DNA Nick End Labeling (TUNEL)" metodu kullanılarak hazırlanan preparatlarda hücrelerde apoptozis değerlendirildi. Direkt ışık mikroskopik incelemede kontrol ve doksorubisin nefropatisi gruplarında glomerüler hücrelerde apoptozis görülmedi. Tübüler-interstisyel hücrelerde ise nefropati grubunda; apoptozise uğrayan hücreler olduğu görüldü. Oysa kontrol, ve aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisi yapılan kontrol ve nefropati gruplarında tübüler-interstisyel hücrelerde apoptozis gösteren hücrelere rastlanmadı.

Apoptozisin TUNEL metodu ile kantitatif olarak değerlendirilmesi: Nefropati grubunda apoptozis gösteren tübüler hücre sayımları total tübüler hücrelere oranlandığında ortalama 0.212 oranında apoptozis saptandı. Kantitatif olarak apoptozis gösteren tübül hücre sayımları 193-323 apoptotik hücre arasında değişmekteydi (231.50 ± 23.05). Kontrol ve aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisi alan nefropati gruplarında apoptozis saptanmadı.

Yine nefropati grubunda interstisyel apoptozis 476.20 ± 78.01 bulunurken, kontrol grubu ve tedavi alan nefropati gruplarında belirgin bir apoptozis izlenmedi.

Tübüleri-interstisyel hücre sayılarındaki artış ile tübülointerstisyel apoptozis arasında istatistiksel olarak yüksek korelasyon olduğu bulundu ($r = 0.90$; $p < 0.05$). Tübüleri hücre sayısı ile tübüleri apoptozis arasında da anlamlı ve yüksek bir korelasyon bulundu ($r=0.90$; $p < 0.05$).

PCNA değerlendirilmesi: Kontrol grubunda ortalama PCNA pozitif hücre sayısı tübüleri ve interstisyel alanlarda sırası ile 32.50 ± 5.08 ve 14.57 ± 2.46 iken, doksorubisin nefropatisi oluşturulan sıçanların böbreklerinde 44.85 ± 2.62 ve 18.40 ± 1.48 olarak bulundu. İki grup arası fark anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). Aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisi alan nefropati gruplarında ancak ikişer örnek PCNA ile boyanabildi. Aminoguanidin tedavisi alan nefropati grubunda tübüleri ve interstisyel alanlarda PCNA ile boyanan hücreler sırası ile 9.42 ve 3.06 iken, pentoksifilin tedavisi alan nefropati grubunda 11.5 ve 4.0 idi.

TARTIŞMA:

Dokсорubisin nefropatisi, idiopatik nefrotik sendrom modeli olarak geliştirilmiştir (1). İdiopatik nefrotik sendrom minimal lezyon hastalığı, fokal glomeruloskleroz ve diffüz mezangial proliferasyon glomerulopatilerinden oluşan grup olarak anılmaktadır. Bu nefropatide, ışık mikroskopisinde, glomerülde mezangial matrikste hafif derecede genişleme, bazı glomerüllerde mezangial proliferasyon ve ayaksı çıkıntılarda silinme görülmüştür (1). Bu nefropatinin klinik olarak en şiddetli olduğu zaman diliminin 3.-4. hafta olduğu histopatoloji ile gösterilmiştir. Sıçanlarda, dokсорubisinle oluşturulan nefropatide 1. haftadan itibaren idrar proteininin arttığı, 3.-4. haftada en yüksek değerine ulaştığı ve 5. haftaya kadar proteinürinin devam ettiği, sonra da azalarak belli bir değerde 8. haftaya kadar saptanabildiği gösterilmiştir(1). Ayrıca bu modelde TNF- α düzeyinin arttığını 3. haftada en belirgin olarak gözlemlemişlerdir(44). Bu nedenlerle çalışmamızda sıçanlara dokсорubisin uyguladıktan 21 gün sonra böbrekleri izole edilmiş ve planlanan araştırmalar yapılmıştır.

Dokсорubisin nefropatisi gelişen grupta proteinürinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gösterilerek klinik olarak nefropati doğrulanmıştır.

Yaptığımız çalışmada, literatürle uyumlu olarak, HE kesitlerin ışık mikroskopik incelemesi sonucunda dokсорubisin uygulanan nefropati grubunda, glomerüllerde segmental-fokal mezangial hipersellülarite şeklinde hücre sayısı artışı saptanmıştır(1). Ancak istatistiksel olarak kontrol grupları ile dokсорubisin nefropatisi grubu arasındaki sayısal fark anlamlılık kazanmamıştır. Bu bulgu, olayın segmenter ve fokal olması ile açıklanabilir. Öte yandan aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisinin ise, nefropati grubunda glomerüler hücre sayılarında histopatolojik olarak dikkati çeken ancak anlamlı olmayan artışı önlediği saptandı. Bu bulgular aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisinin glomerüler hücre sayılarına etki ettiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, dokсорubisin nefropatisinde ve benzer nefropatilerde literatürde fazla vurgulanmayan bir bulgu olarak (1,2), tübüler-interstisyel alanda da değişiklikler olduğu görülmüştür. Dokсорubisin uygulanan nefropati grubunda tübüler ve interstisyel hücre sayılarında artışın olduğu kantitatif olarak gösterilmiştir. Tübüler hücre sayısındaki artış nefropati grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisi ile ise tübüler hücre sayısında azalma olduğu yani bu tedavilerin tübulo-interstisyel alandaki inflamatuvar değişiklikleri belirgin olarak geriletmediği görülmüştür.

Tübulo-interstisyumdaki olaylara özellikle fokal glomeruloskleroz modellerinde dikkat çekilmekte, böbrek hasarında belirleyici rolü vurgulanmaktadır(45). Çalışmamızdaki tübulo-interstisyel bulgular da bu bölgedeki değişikliklerin önemini belirtmektedir. Aminoguanidin ve pentoksifilin tedavisine cevap da bu bölgedeki değişikliklerde kendini göstermiştir. Tübulo-interstisyel inflamasyonun, glomerül hastalığının sonucunu belirlediği giderek kabul görmektedir (45). Tübüllerin ve interstisyumun olaya katılması üç temel mekanizma ile açıklanmaktadır: 1. Bowman kapsülünden mediyatörlerin interstisyuma diffüzyonu: Bu diffüzyondan periglomerüler lökosit, makrofaj infiltrasyonu sorumlu olabilir. 2. Peritübüler kapillerler boyunca mediyatörlerin akımı: Peritübüler kapillerlere akan bazı adezyon molekülleri ve sitokinler bu yolla interstisyel inflamasyona yardımcı olabilirler. 3. Tübüler hücrelerin inflame glomerulden süzülen pro-inflamatuvar moleküllere cevap vermesi: Bu şekilde uyarılan tübüler hücreler tübüler ve interstisyel inflamasyonu başlatabilirler(45). Bu konudaki çalışmalar giderek artmaktadır.

İnflamatuvar böbrek hastalıklarında iNOS'un aktivasyonu ile patolojik miktarlarda NO açığa çıktığı in situ immün kompleks glomerulonefritlerinde ve nefrotoksik nefritte gösterilmiştir (46,47). Artmış NO sentezinin inflamasyonda rol oynadığı düşünülmektedir. Pekçok in vivo çalışma artmış NO yapımından infitre eden makrofajların ve benzeri hücrelerin sorumlu olduğunu desteklemektedir (5,47). Oysa in vitro olarak sitokinlerin etkisiyle, tüm glomerüler hücrelerde iNOS'un indüklenebildiği gösterildiğinden, artmış NO sentezinden nefrondaki yerel hücrelerin de sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (48-50).

Çalışmamızda sunulan doksorubisin nefropati modelinde de böbreklerde NO sentezinde belirgin bir artış olduğu düşünülmektedir. Doksorubisin uygulanarak nefropati oluşturulan sıçanların idrar nitrit düzeyleri de kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan nefropati oluşturulan sıçanların serum nitrit düzeylerinde bu artış saptanmamıştır. İdrarda artmış nitrit düzeyleri, NO sentezindeki artışı göstermesinin yanısıra, serum düzeylerinin değişmemesi de NO kaynağının böbrekler olduğunu desteklemektedir. NOS inhibitörü olan ve iNOS'a selektivitesinin daha fazla olduğu bildirilen (12) aminoguanidin ile tedavi nefropati grubunda idrar nitrit düzeylerindeki artışı inhibe etmiştir. Pentoksifilin de bilindiği gibi TNF- α sentezini azaltan (30) ve makrofaj hücre kültüründe iNOS indüksiyonunu inhibe ettiği (29) ileri sürülen bir ajandır. Pentoksifilin tedavisinin de nefropati grubunda idrar nitrit düzeyindeki artışı önlemesi yine bu bağlamda TNF- α ve /veya iNOS indüksiyonu inhibisyonu üzerinden değerlendirilebilir.

Çalışmamızda doksorubisin ile nefropati oluşturulan sıçanlardan izole edilen böbreklerin damar yatağının vazokonstriktör ve vazodilatör ajanlara verdiği yanıtlar değerlendirilmiştir. Nefropati grubunda fenilefrin'in gerçekleştirdiği perfüzyon basıncında artış cevabının, kontrol gruba göre anlamlı olarak daha az olduğu ($p<0.05$) (şekil 1); aminoguanidin ve pentoksifilin tedavileri ile ise fenilefrin cevabındaki azalmanın önlenemediği görülmüştür. Bu bulgular doksorubisin nefropatisinde fenilefrine verilen vazokonstriktör cevaptaki azalmada böbreklerde NO sentezindeki artışın rolünü telkin etmektedir. Nefropatili sıçanların idrarlarında nitrit düzeylerinin artmış olması bu yorumu desteklemektedir. Ayrıca, aminoguanidin'in böbrek damar yatağında feniefrine verilen cevaptaki azalmayı ve idrar nitrit düzeyindeki artışı önlemesi de doksorubisin uygulamasına bağlı nefropatide böbrekte iNOS indüksiyonuna bağlı NO sentezindeki artış olabileceği yorumunun bir diğer kanıtıdır. Pentoksifilin tedavisi ile de nefropatili sıçan böbreğinde fenilefrin cevabındaki azalma ve idrar nitrit düzeyindeki artışın önlenmiş olması yine pentoksifilin ile TNF- α ve/veya iNOS'un indüksiyonunun inhibisyonu üzerinden değerlendirilebilir.

Çalışmamızda nefropati grubundan izole edilen perfüze sıçan böbreğinde asetilkolin ile elde edilen perfüzyon basıncındaki azalma cevabının kontrol grubundan anlamlı olarak daha az olduğu saptandı. Asetilkolin'in çeşitli türlerden izole edilen perfüze böbrek preparatlarında endotel bağımlı vazodilatasyon yaptığı ve NO sentezini inhibe eden L-arjinin analogları kullanılarak bu cevapta NO'nun aracılık ettiği gösterilmiştir (51). Dolayısıyla çalışmamızda doksorubisin uygulanan grupta asetilkolin ile elde edilen bulgular, böbrek damarlar endotelinden NO salınımının nefropatiye bağlı olarak azaldığını göstermektedir. Bu çeşitli mekanizmalarla olabilir. Nefropatili böbrek damar yatağında yapısal NOS aracılı NO sentezinde bir azalma söz konusu olabilir. TNF- α ve diğer sitokinlerin artışının endotel kaynaklı yapısal NOS'un "down-regülasyonu"na neden olduğu bildirilmiştir (52). iNOS indüksiyonu ile fazla miktarda oluşan NO'nun kendisinin veya serbest oksijen radikalleri ile etkileşimi sonucu oluşan bileşiklerin (peroksinitrit gibi) endotel hücrelerinde fonksiyon bozukluğu veya hasar yapabildiği de ileri sürülmektedir (53). Çalışmamızda iNOS inhibitörü aminoguanidin ve TNF- α sentezini ve iNOS indüksiyonunu inhibe eden pentoksifilin ile tedavinin asetilkolin cevaplarındaki

azalmayı önlemesi bu görüşler doğrultusunda değerlendirildiğinde, doksorubisin uygulamasına bağlı asetilkolin cevabındaki azalmada da nefropatiye bağlı iNOS indüksiyonunun rolü ileri sürülebilir. Diğer taraftan endotel aracısız düz kas gevşemesi yaparak vazodilatasyona yol açan papaverin ve sodyum nitroprusiyat cevaplarının nefropati grubunda değişmemesi, sadece endotel-bağımlı cevabın nefropatiye bağlı olarak bozulduğunu göstermektedir.

Apoptozis böbrek hastalıklarının patogenezininde rolü giderek önem kazanan bir konudur. Apoptozisin böbrek hastalıklarındaki olumlu ve olumsuz etkilerinden bahsedilmektedir. Bir yandan apoptozisin istenmeyen hücrelerin temizlenmesi için olumlu etkisi söz konusu olmaktadır. Buna örnek Thyl.1 antikoru ile oluşturulan proliferatif glomerulonefritte, böbrek hastalığının onarımında apoptozis rolüdür; bu modelde proliferatif glomerül hücreler apoptozis ile ortadan kaldırılmaktadır (37,38). Söz konusu hücreler daha çok mezangial hücreler olmaktadır. Öte yandan çeşitli böbrek hastalıklarındaki sklerotik lezyonlarda da TUNEL pozitif yani apoptotik hücreler gösterilmiştir (43,54). Örneğin IgA nefropatisinde apoptotik hücreler temel olarak sklerotik lezyonlarda izlenmiştir (54). Daha da ötesinde bu hastalarda TUNEL pozitif hücrelerin, glomerül sklerotik indeksi ve böbrek fonksiyonlarındaki bozulma ile korelasyon gösterdiği gösterilmiştir. Skleroz ile apoptozis ilişkisi anti-GBM antikoru ile oluşan glomerulopatide de dikkat çekmektedir(41). Bu örnekler “kontrol dışı” apoptozisin fibrotik süreçteki etkisini göstermektedir. Sunulan çalışmada ilk kez doksorubisin nefropatisinde apoptozisin etkinliği ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada sklerotik süreç veya prognoz ile ilişki aranmadığından 3 haftadan sonra izlem sürdürülmemiştir.

Çalışılan kesitlerde, apoptozisin lokalizasyonun tübülointerstisyumda olması dikkat çekicidir. 1998’de İtalya’da düzenlenen EDTA kongresinde bir sunuda da, çeşitli glomerulopatilerde tübüler ve interstisyel alanlardaki apoptozis vurgulanmıştır (55). Çalışmamızda olduğu gibi glomerüllerde apoptozis saptanmamıştır. Araştırmacılar apoptozisin renal tübülointerstisyel fibrozis için tetikleyici bir mekanizma oluşturabileceği sonucuna varmışlardır. Doksorubisin nefropatisi modeli idiopatik nefrotik sendrom için in vitro bir model oluşturduğundan bu glomerulopatide de tübülointerstisyel apoptozisin yeri anlam kazanmaktadır. Çok yeni olan bu bulgunun, yeni araştırmalara ışık tutacağına inanılmaktadır.

PCNA, hücre proliferasyonu için kullanılan bir indekstir (56). Çalışmamızda PCNA ile boyanan hücrelerin sayımı ile, bu özellik araştırılmıştır. Ancak doksorubisin nefropatisi ile kontrol grubu arasında önemli farklılık bulunmamış olması, ışık mikroskopisinde saptanmış olan hücre artımının infiltrasyonla gelen hücreler ağırlıklı olduğunu düşündürülebilir. İnfiltrate olan kan elemanlarının da apoptozis yolu ile temizlendiği bilinmektedir. Gerçekten IgA nefropatisinde de TUNEL pozitif hücreler ile proliferasyon indeksi arasında ilişki saptanamamıştır(54). Gerek bu çalışmada gerekse bizim çalışmamızda PCNA ile TUNEL pozitif hücreler arasında ilişki bulunamamış olması, bu modellerde interstisyumdaki apoptozisin daha çok infiltrate eden hücreler olduğunu düşündürmektedir.

NO ile apoptozis arasındaki bağlantı sinir sistemi hücrelerinde, makrofajlarda, vasküler düz kas hücreleri ve pankreas hücrelerinde daha önce gösterilmiştir(57). Bu ilişkiyi açıklamak için en yaygın kabul gören görüş, NO’in süperoksit anyonu ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan peroksinitrit anyonunun yüksek oksidan özelliği nedeni ile hücre ölümünü indüklediği şeklindedir (57). NO ile aktive olan endonükleaz da DNA’nın nukleozomal fragmanlara ayrılmasına ve apoptozisin indüklenmesine doğrudan yol açabilmektedir (33). Yine NO ile uyarılan apoptoziste programlamanın p53 ekspresyonu ile belirlendiği ileri sürülmüştür (7). Bu reaksiyonlarda fazla miktarlarda NO gerektiğinden, bundan iNOS indüksiyonu sonucu sentezlenen NO sorumlu olabilir. Wang ve ark (7) ilk kez böbrekte iNOS ekspresyonu ve apoptozis arasında ilişki göstermişlerdir. Söz konusu çalışmada iNOS immünohistokimyasal yöntemle boyanmıştır. Bizim çalışmamızda da ilk kez deneysel böbrek modelinde NO ile apoptozis arasında ilişki ortaya konmuştur; Doksorubisin nefropatisi grubunda yüksek idrar nitrit düzeylerine ve böbrek vasküler yanıtlarındaki anlamlı değişikliklere histopatolojik olarak

apoptozisin varlığı eşlik etmiştir. Yine oldukça selektif bir iNOS inhibitörü olan aminoguanidin ile NO yapımı engellenmesi ile apoptozisin belirgin olarak azalmış olması da bu ilişkinin kanıtıdır. Gerçekten aminoguanidin tedavisi alan nefropati grubunda idrar nitrit düzeylerinin de düşmesi ile korele olarak TUNEL pozitif hücrelerin kaybolduğu gösterilmiştir. Böylece bu böbrek hastalığında NO inhibitörü ile böbrek patofizyolojisinin etkilendiği izlenimi alınmıştır.

Yine çalışmamızda ilk kez pentoksifilin böbrek hastalığı patofizyolojisine etkisi ve olası koruyucu rolü ortaya çıkmıştır. Pentoksifilin verilen sıçanlarda da TUNEL pozitif hücrelerin görülememesi, apoptozisin inhibe olduğuna işaret etmektedir. Pentoksifilin bu etkilerini $TNF\alpha$ ve /veya iNOS üzerine inhibe edici etkisi ile de gösteriyor olabileceği düşünülmüştür. Gerçekten de $TNF\alpha$ hem tübulointerstisyel inflamasyonu arttırıcı bir sitokin hem de apoptozisin bir düzenleyicisidir.

Bu çalışmada, diğer bazı hücre tiplerinde gösterildiği gibi, böbrek hücrelerinde de iNOS ile apoptozisin indüklenebildiği sonucuna varılmıştır. İlk planda, apoptozisin bizim çalışma modelimizde onarım sürecinde proliferen olmuş hücreler için etkin bir "temizleme" mekanizması olduğu düşünülebilir (7). Öte yandan doksorubisin nefropatisinde süregen proteinürinin uzun dönemde fokal sklerotik değişiklikler yaptığı da bilinmektedir(1). Burada süregen bir apoptozis hücrelerin istenmeyen kaybına yani skara yol açarak olumsuz bir etki de gösterebileceği unutulmamalıdır.

Sonuç olarak deneysel bir glomerulonefrit modelinde artmış NO yapımı ortaya konmuş ve apoptozis ile ilişkisine değinilmiştir. Çalışmamızdaki tübulointerstisyel bulgular da dikkat çekicidir. NO etkinliğinin ve apoptozisin böbrek hastalıklarındaki prognostik önemini belirlemek için ise yeni seri çalışmalar gerekmektedir.

Tablo 1: Gruplara göre glomerüler ve tübüler hücre sayımları ile proteinüri düzeyleri

	Kontrol	Kontrol + AG	Kontrol + PTX	Nefropati	Nefropati + AG	Nefropati + PTX
GLOMERÜLER HÜCRE SAYISI	76.80±3.11	76.00±5.60	73.80±4.94	86.10±5.33*	73.20±1.37	68.80±2.15
TÜBÜLER HÜCRE SAYISI	771.60 ±4.19	778.00 ±18.11	906.20 ±20.92	1117.80 ±48.76**	899.50 ±8.95	945.50 ±8.76
PROTEİNÜRİ (mg/gün)	131.25 ± 28.67	183.75 ±42.39	168.0 ±39.95	355.0 ±34.2**	169.60 ± 86.25	136.80 ±77.86

AG = Aminoguanidin; PTX = Pentoksifilin

* Nefropati + AG ve Nefropati+ PTX gruplarından farklı (p<0.05)

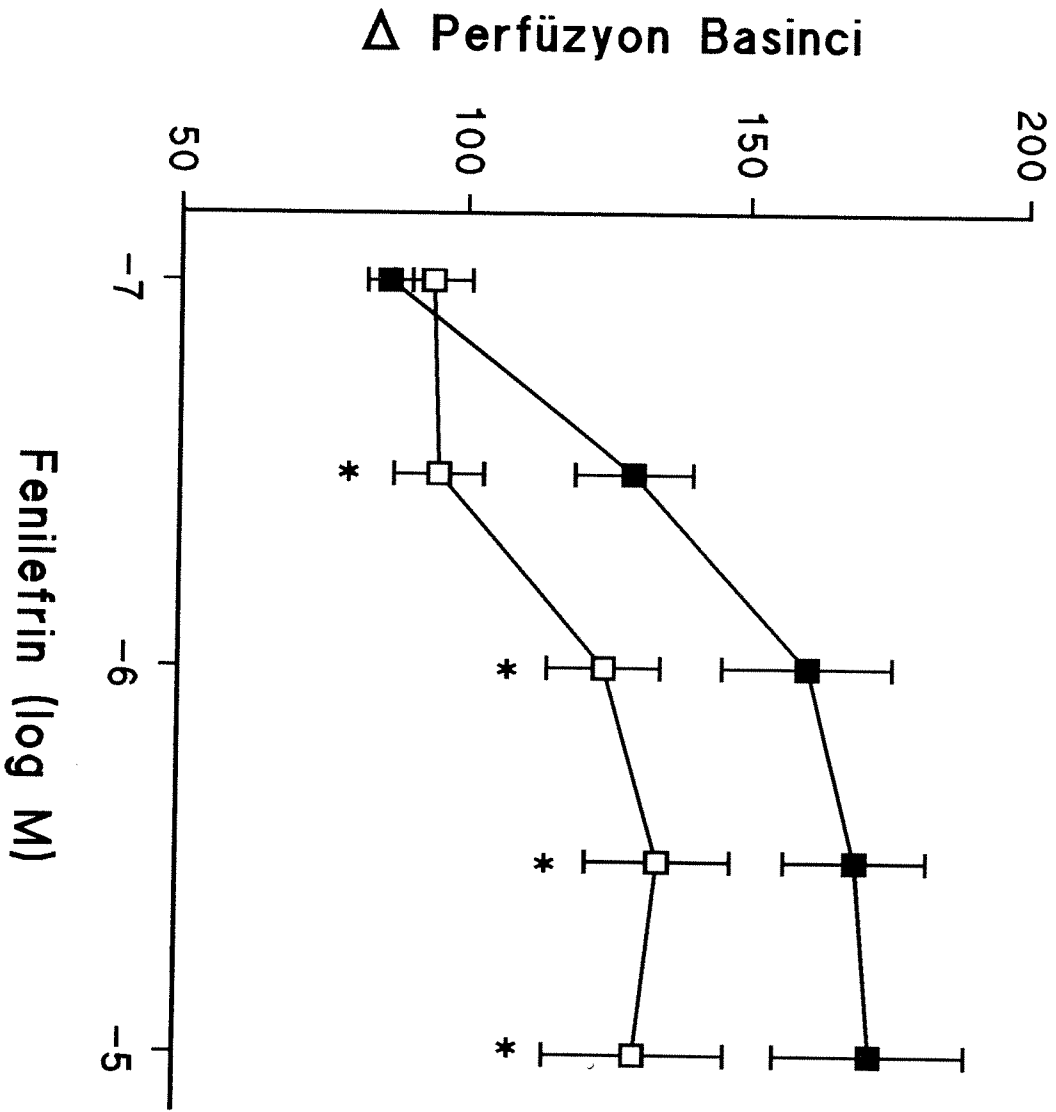
**Diğer tüm gruplardan farklı (p<0.05)

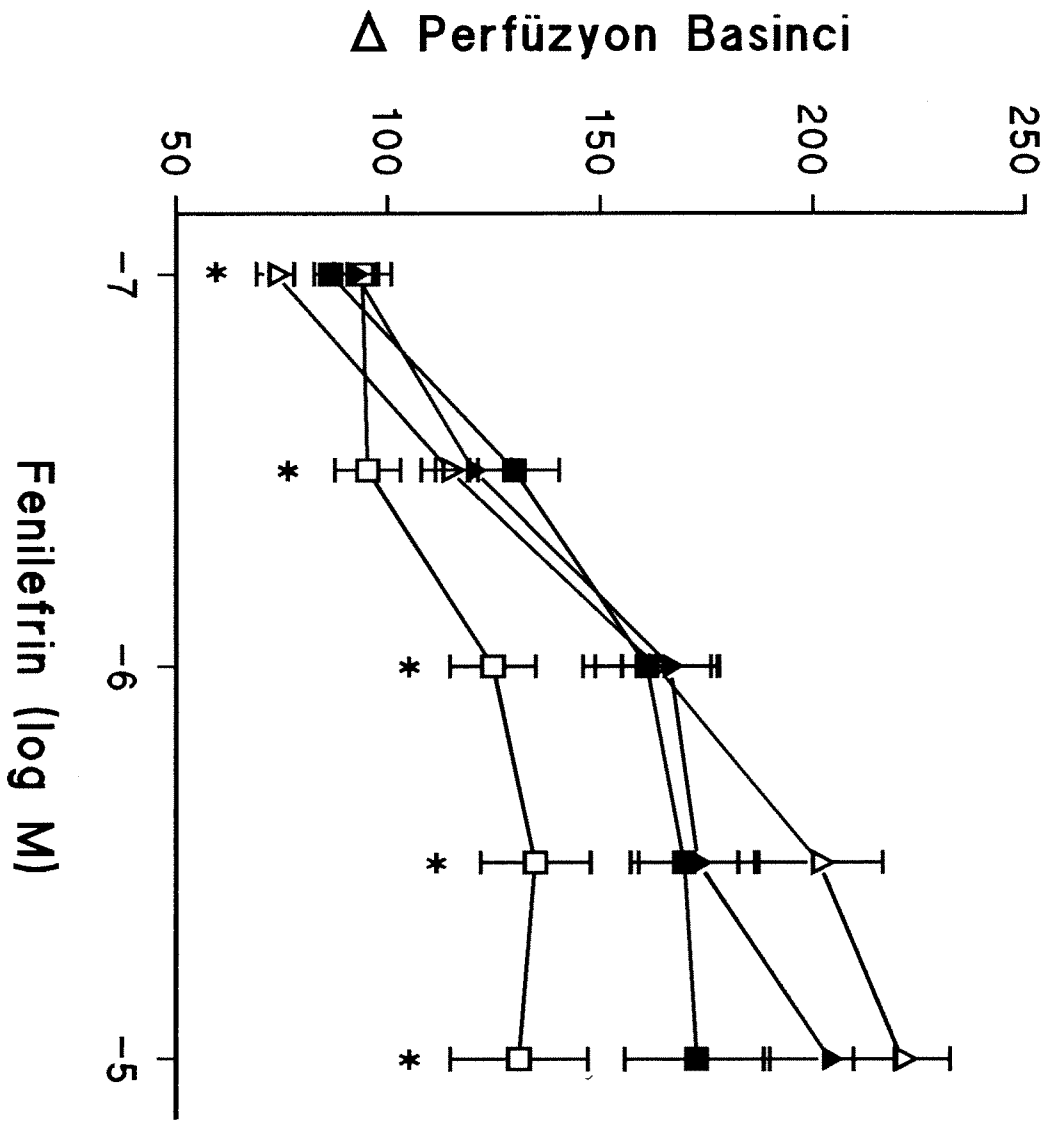
Tablo 2: TUNEL boyama yöntemi ile tübüller ve interstisyumda saptanan apoptozis ve idrar nitrit düzeyleri

	Kontrol	Kontrol + AG	Kontrol + PTX	Nefropati	Nefropati + AG	Nefropati + PTX
TÜBÜLER APOPTOZİS	-	-	-	231.50 ±23.05	-	-
İNERSTİSYEL APOPTOZİS	-	-	-	476.20 ±78.01	-	-
İDRARDA NİTRİT (µM)	3.24 ±1.81	7.37 ±2.51	8.57 ±0.8	31.25 ±6.54*	11.09 ±1.83	9.56 ±2.19

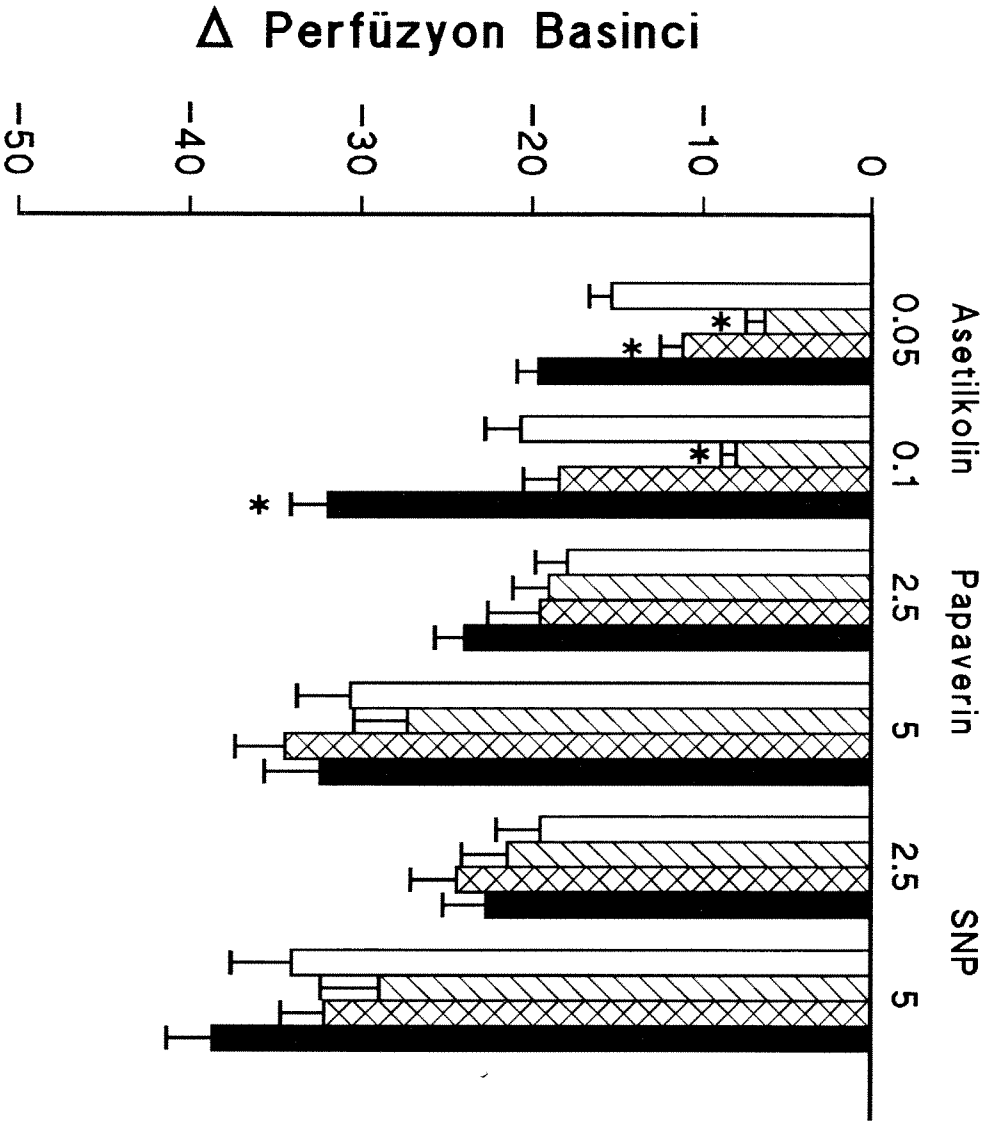
AG = Aminoguanidin; PTX = Pentoksifilin

* Diğer tüm gruplardan farklı (p<0.05)





Doz (μg)



Referanslar:

1. Weening JJ and Rennke HG. Glomerular permeability and polyanion in Adriamycin nephrosis in the rat. *Kidney International* 1983; 24: 152-159.
2. LJ Ignarro. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney International* 1996; 49: 2-5.
3. Woltz ML, Schmetterer W, Ferber E et al. Effect of nitric oxide synthase inhibition on renal hemodynamics in man. *Am J Physiol* 1997; 272: F178-F182.
4. Nathan C, Xie Q-w: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269: 13725-13728.
5. Cattal V: Nitric oxide - potential mediator in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10:759-774,.
6. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7162-7166.
7. Wang JS, Tseng HH, Shih DF, Jou HS, Ger LP: Expression of inducible nitric oxide synthase and apoptosis in human lupus nephritis. *Nephron* 1997;77: 404-411.
8. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;14:126-130.
9. Kolde H, Ichikawa I (eds). Progression of chronic renal diseases. *Contrib Nephrol* 1996;118:48-53.
10. Akira S, Hiroshi K, Yukinari M, Masamichi I, Yuichi S, Nobuaki Y: Glomerular capillary regeneration and endothelial cell apoptosis in both reversible and progressive models of glomerulonephritis. *Contrib Nephrol* 1996; 118: 29-40
11. Thiemeermann C. The role of L-arginine: Nitric oxide pathway in circulatory shock. *Adv Pharmacol* 1994; 28: 45-79
12. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV. International union of Pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 137-42
13. Mohaupt MG, Elizie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CL, Kone BC. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Kidney Int* 1994;46:653-665.
14. Tojo A, Gross SS, Zhang L, Ticher CC, Schmidt HHHW, Wilcox CS, Madsen K: Immunocytochemical localization of distinct isoform of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of the normal kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994;4:1438-1447.
15. Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothiandan D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released EDRF. *J Pharm Exp Ther* 1986; 237: 529-38

16. Knowles RG, Moncada S. NO synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58
17. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;138:109-142.
18. Raij L, Baylis C. Glomerular action of nitric oxide. *Kidney Int* 1995;48:20-32.
19. Shultz PJ, Archer SL, Rosenberg ME: Inducible nitric oxide synthase mRNA and activation glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 1994;46:683-689.
20. Wilkes M, Pall A, Garner C et al: Nitric oxide production by human glomerular epithelial cells. *JASN* 1994; 5:26.
21. Pfeilschifter J, Kunz D, Muhl H: Nitric oxide: an inflammatory mediator of glomerular mesangial cells. *Nephron* 1993; 64:518-525.
22. Sadayoshi I, Oscar A, Carretero, Keishi A: Nitric oxide in the juxtaglomerular apparatus. *Kidney Int* 1996;49:S6-S8.
23. Braam B, Koomans HA: Modulation of tubuloglomerular feedback (TGF) by intraluminal and nitro-L-arginine (NLA) administration in rats (abstract). *J Hypertens* 1994; 12(Suppl 3):S31.
24. Jansen A, Cook T, Taylor GM et al. : Induction of nitric oxide synthase in rat immunocomplex glomerulonephritis. *Kidney Int* 1994; 45:1215-1219
25. Cook HT, Ebrahim E, Jansen AS, Foster GR, Largen P, Cattell V: Expression of the gene for inducible nitric oxide synthase in experimental glomerulonephritis in the rat. *Clin Exp Immunol* 1994; 97:315-320
26. Shultz PJ, Raij L: Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. *J Clin Invest* 1992; 90:1718-1725
27. Floege J, Johnson RJ, Gordon K, Iida H, Pritzl P, Yoshimura A, Campbell C, Alpers CE, Couser WG: Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis *Kidney Int* 1991;40:477-488.
28. Corbett JA, Tilton RG, Chang K et al. Aminoguanidine, a novel inhibitor of NO formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 1992; 41: 552-6
29. Lauterbaach R, Grabowska A, Marcinkiewicz J. Effect of pentoxifylline on NO released by murine macrophages. *Biol Neonate* 1995; 67: 72-76
30. Zabel P, Schade FU, Schlaak M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. *Immunobiol* 1993; 187: 447-63
31. Savill J: Apoptosis and kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994;5:12-21
32. Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobe G, Connor J, O'Toole KM, et al: Morphologic, biochemical and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* 1992;140:831-838.
33. Sarih M, Souvannavong V, Adam A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 503-8

34. Gobe GC, Axelsen RA: Genesis of renal tubular atrophy in experimental hydronephrosis in the rat. *Lab Invest* 1987;56:237-281.
35. Harrison DJ: Cell death in the diseased glomerulus. *Histopathology* 1988;12:679-683.
36. Savill J, Smith J, Sarraf C, Ren Y, Abbott F, Rees A: Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. *Kidney Int* 1987;42: 924-936.
37. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Johnson RJ, Savill J: Mesangial cell apoptosis: The major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 1994;94:2105-2116.
38. Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N: Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1995;47:114-121.
39. Yamanaka N, Ishisaki M: Anti-thymocyte antibody induced mesangiolytic nephritis: in Hatono M (ed): *Proceeding of the Xith International Congress of Nephrology*. Tokyo: Springer, 1991; 1004-1013.
40. Yamamoto T, Wilson CB: Quantitative and qualitative studies antibody-induced mesangial cell damage in the rat. *Kidney Int* 1987;32:514-525.
41. Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Glomerular Capillary regeneration and endothelial cell apoptosis in both reversible and progressive models of glomerulonephritis. *Contrib Nephrol* 1996;118:48-53.
42. Kawasaki K, Yaoita E, Yamamoto T, Kihara I. Depletion of CD8-positive cells in nephrotoxic serum nephritis of WKY rats. *Kidney Int* 1992;41:1517-1526.
43. Yoshimura A, Sugeno Y, Uda S, Inui K, Shigeki I, Taira T, Ideura T. Expression of apoptosis-preventing Bcl-2 protein and inducing fas antigen in glomeruli of IgA nephropathy. *Contrib Nephrol* 1996;118:48-53.
44. Korzets Z, Pomeranz A, Golan E, Bernheim J. Pefloxacin in adriamycin induced nephrotic syndrome in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:286-8.
45. Savill J, Rees AJ. Mechanisms of glomerular injury. In Davison AM, Cameron JS, Grunfeld J-P, Kerr DNS, Ritz E, Winearls (eds). *Clinical Nephrology* (2nd ed) Oxford: Oxford University Press, 1998; 403-440
46. Jansen A, Cook T, Taylor GM et al. : Induction of nitric oxide synthase in rat immunocomplex glomerulonephritis. *Kidney Int* 1994; 45:1215-1219
47. Cook HT, Ebrahim E, Jansen AS, Foster GR, Lagen P, Cattell V: Expression of the gene for inducible nitric oxide synthase in experimental glomerulonephritis in the rat. *Clin Exp Immunol* 1994; 97:315-320

48. Nicholson AG, Haites NE, McKay NG, Wilson HM, MacLeod AM, Benjamin N: Induction of nitric oxide synthase in human mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193:1269-1274
49. Marsden PA, Brock TA, Ballermann BJ: Glomerular endothelial cells respond to calcium-mobilizing agonists with release of EDRF. *Am Phys Soc* 1990; 258:F2295-F1303
50. Wilkes M, Pall A, Garner C et al: Nitric oxide production by human glomerular epithelial cells. *JASN* 1994; 5: 26-32
51. Bachmann S, Mundel P. NO in the kidney. *Am J Kidney Dis* 1994; 24: 112-29
52. Yoshizumi M, Perella M, Burnett JR et al. TNF downregulates an endothelial NO synthase mRNA by shortening its half life. *Circ Res* 1993; 73: 205-9
53. Estrada C, Gomez C, Martin C et al. NO mediates TNF toxicity in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 475-82
54. Makino H, Kashihara N, Sugiyama H, Sekikawa T, Ota Z. Role of apoptosis in the progression of glomerulosclerosis. *Contrib Nephrol* 1996; 118: 41-7
55. Goumenos DS, Thomas G, Sotsiou F et al. Apoptosis and myofibroblasts in glomerulonephritides. (abstract) *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: A19
56. Hattori T, Shindo S, Kawamura H. Apoptosis and expression of Bax protein and Fas antigen in glomeruli of a remnant kidney model. *Nephron* 1998; 79: 186-91
57. Dalkara T, Moskowitz A. Programmed cell death and nitric oxide toxicity: What is the evidence? In Kriegstein J, Oberpichler-Schwenk H (eds). *Pharmacology of cerebral ischemia*. Stuttgart, 1996: 1-7.