

# DeneySEL Hipertansiyon ve Diyabet Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Böbreğin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi

THE IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF KIDNEY AN EXPERIMENTALLY INDUCED HYPERTENSIVE AND DIABETIC RAT MODEL

Serap CİLAKEr MICİLİ<sup>1</sup>, Bekir Uğur ERGÜR<sup>1</sup>, Candan ÖZOĞUL<sup>2</sup>, Sülen SARIOĞLU<sup>3</sup>, Alper BAĞRIYANIK<sup>1</sup>, Kazım TUĞYAN<sup>1</sup>, Çetin PEKÇETİN<sup>1</sup>, Ülker SÖNMEZ<sup>1</sup>, Işıl TEKMEN<sup>1</sup>, Güven ERBİL<sup>1</sup>, Gül GÜNER AKDOĞAN<sup>4</sup>, Doğan ÖZYURT<sup>1</sup>, Zişan BULDAN

<sup>1</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı

<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı

<sup>3</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

<sup>4</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, deneysel olarak ayrı ayrı ve birlikte diyabet ve hipertansiyon modeli oluşturulan sıçanlarda, lipoik asidin hipertansif ve diyabetik böbrek üzerindeki tedavi edici/hasar önleyici etkisinin araştırılması amaçlandı.

**Yöntemler:** Çalışmamızda Wistar cinsi ratlar 8 gruba ayrıldı (n=7). I. grup; Kontrol, II. Grup; Diabetes Mellitus, III. grup; 5/6 Nefrektomi, IV. Grup; Lipoik asit, V. Grup; 5/6 Nefrektomi+Diyabet, VI. grup, Diyabet+Lipoik asit VII. Grup; 5/6 Nefrektomi+Lipoik asit ve VIII. Grup; 5/6Nefrektomi+Diyabet+Lipoik asit. Diyabet modeli 45 mg/kg STZ enjeksiyonu ile oluşturuldu ve hipertansiyon modeli için 5/6 nefrektomi modeli uygulandı. dl-α-Lipoik asit 30mg/kg/gün olacak şekilde 8 hafta oral gavaj yöntemi ile deneklere uygulandı. Böbrek dokuları rutin ışık mikroskopik doku takip işlemlerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. İmmunohistokimyasal olarak AT1 (Anjiyotensin II tip I reseptörü), VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) ve ET1 (Endotelin 1) antikorları işaretlendi.

**Bulgular:** Diyabet ve nefrektomi modellerinin ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı deneysel gruplarda (Grup 2,3,5), glomerüloskleroz, mononükleer hücre infiltrasyonu, intersitisiyel fibrozis, damarlarda ve tübüllerde dilatasyon ve hiyalin materyal birikimi ile tübüler yapıların dejenerasyonu gözlemlendi. Aynı gruplarda tübülointersitisiyel ve glomerüler AT1 azalırken, VEGF ve ET1 artış göstermişti. Lipoik asit tedavi gruplarında ise AT1'de artış, VEGF ve ET1'de ise Kontrol ve Lipoik asit grubuna benzer şekilde azalma gözlemlendi.

**Sonuç:** Diyabet ve hipertansiyonun birlikte gözlenmesinin böbrek hasarının hızlı ilerlemesine neden olduğu, lipoik asidin bu hastalıklara karşı böbrek üzerinde tedavi edici etkisinin olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar sözcükler:** Böbrek, diyabet, hipertansiyon, immunohistokimya, lipoik asit

## SUMMARY

**Objective:** In this study, experimental diabetes and nephrectomy have been applied

## Serap CİLAKEr MICİLİ

Dokuz Eylül Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji AD  
35340 İnciraltı / İZMİR

separately and together in order to investigate possible therapeutic/damage prevention effects of Lipoic acid on hypertensive and diabetic rat kidneys.

**Methods:** Wistar rats were divided into 8 groups (n=7); Group 1; Control, Group 2; Diabetes Mellitus, Group 3; 5/6 Nephrectomy, Group 4; Diabetes Mellitus+5/6 Nephrectomy, Group 5; Lipoic acid administration, Group 6; Diabetes Mellitus+Lipoic acid, Group 7; 5/6 Nephrectomy+Lipoic acid, Group 8; Diabetes Mellitus+5/6 Nephrectomy+Lipoic acid groups respectively. Diabetes was formed by 45mg/kg STZ injection and for hypertension nephrectomy 5/6 model was applied. dl- $\alpha$ -Lipoic acid 30mg/kg/day was fed by oral gavage for 8 weeks. Kidney tissues were embedded into paraffin block after routine light microscopic preparation. AT1 (Angiotensinojen II type 1 receptor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and ET1 (Endothelin) antibodies were labelled immunohistochemically in same group.

**Results:** In groups where diyabetes and nephrectomy were applied separately and together, glomerulosclerosis, mononuclear cell infiltration, interstitial fibrosis, vascular and tubular dilatation and hyalin deposition and degeneration of tubular structures were seen in glomerules. In the same group: tubulointerstitial and glomerular AT1 was decreased but VEGF and ET1 were increased. In Lipoic acid treatment groups, AT1 was increased and VEGF and ET1 were decreased similar to Control and Lipoic acid group.

**Conclusion:** We have come to the conclusion that diabetes nd hypertension together increases the rate of renal injury and lipoic acid has therapeutic effect on kidney.

**Key words:** Kidney, diabetes mellitus, hypertension, immunohistochemistry, Lipoic acid

Diabetes Mellitus (DM), hiperglisemi, dislipidemi, glikozürü ve bunlara eşlik eden bir grup metabolik bozukluğu içine alan kronik bir metabolik hastalıktır (1,2). Hipertansiyon ise mikrovasküler ve makrovasküler hastalıklar için bilinen bir risk faktörü olup diyabeti olan bireylerde oldukça yaygın bir durumdur (3). Normal populasyona göre diyabeti olan bireylerde iki kat daha fazla gözlenir (3). Günümüzde hızla artan ve toplumlarda çok sık olarak rastlanan diyabet ve hipertansiyonun birlikte gözleendiği durumlar, progresyonu hızlı gelişen böbrek hasarına neden olmaktadır ve kronik böbrek yetersizliği olgularının yaklaşık yarısından sorumludur (4).

Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS) kan basıncının düzenlenmesinde ve hücre dışı sıvı hacminin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Anjiyotensin II (AII), RAS'ın esas mediatörüdür (5). Geniş sprektrumlu bir hormondur ve dolaşım dışında böbrekler, adrenaller, beyin, hipofiz bezi, damar düz kasları, kalp ve sempatik sinir sistemi gibi dokularda da bulunmaktadır (5). Peptid hormonlar gibi hedef hücrelerinin plazma membranlarında bulunan AII tip I (AT1) ve AII tip II (AT2) reseptörleri aracılığı ile etki ederler.

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), doku büyümesi ve organ hasarında tamir mekanizması süreci

olan anjiyogenezis ve vaskülogenezis süreçlerinde rol alan bir bileşendir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süperalesinin üyesidir (6). VEGF ve VEGF reseptörlerinin tamamı normal glomerüler podositler ve renal tübüllerin fonksiyonu için gereklidir (7).

Endotelin 1 (ET1), ilk olarak domuz aorta endotel hücrelerinden izole edilmiş 21 aminoasitlik siklik peptid yapısında bir moleküldür. Organizmada sadece endotel hücrelerinde değil kardiyomiyositlerde, böbrek epitel hücrelerinde, nöronal stromal hücrelerde, lökositlerde de varlığı gösterilmiştir (8). Hemodinamik etkilerinin yanı sıra ET1'in tuz ve su geri emilimi, asit-baz dengesi inflamatuvar hücre aktivasyonu glomerüler ve mezengiyal hücre büyümesine ilişkin de etkileri bulunmaktadır (9).

Diyabetik nefropatide, hiperglisemi sonucunda solübl faktörlerin etkileşimi örneğin büyüme faktörleri, AT II, Endotelin (ET) gibi moleküllerin miktarında değişiklik, İleri Glikasyon (İGÜ) ürünlerinde artış, renal mikrosirkülasyonda hemodinamik değişiklikler (glomerüler hiperfiltrasyon, glomerüler kapiller basınçta artış), glomerüllerde yapısal değişiklikler (ekstrasellüler matrikste artış, bazal membran kalınlaşması, mezenjiyal genişleme, fibrozis) gözlenir (2,10). Hipertansif renal hasar patofizyolojisi ise farklı seyretmekte ve pregglomerüler

vasküler dilatasyon ve bozulmuş renal otoregülasyon sistemik kan basıncı yükünün büyük bir oranda renal mikrovasküler yatağa yansımaya neden olmaktadır. Bu nedenle, hasar vasküler yapıdan daha fazla glomerüler düzeyde gerçekleşmektedir (11). Hipertansiyonun tek başına böbrek hasarı üzerine etkileri tartışmalı iken, diyabetik nefropatisi olan deneklere sistemik hipertansiyon eklendiğinde glomerüloskleroz gelişiminin arttığı gözlenmiştir (11).

Diyabet kronik metabolik bir hastalık olmanın yanı sıra, artmış bir oksidatif stres durumudur. Organizma ise bu zararlı radikallerin etkisinden kurtulmak için enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Ayrıca ekzojen olarak alınabilen antioksidanlar ile serbest radikallerin etkileri ile savaşılmaya çalışılmaktadır. Hipertansiyon tedavisinde de benzer şekilde antioksidan tedaviler uygulanabilmektedir. Günümüzde çok sık bahsedilen antioksidanlardan biri olan Lipoik Asit (LA), hem yağda hem de suda çözünen oksijen radikallerine karşı güçlü bir antioksidandır (12-14). Antioksidan özelliği kendisinin dihidro lipoik aside indirgenirken, serbest radikalleri temizlemesinden ve metal iyonlarıyla şelat yapmasından kaynaklanmaktadır (12-14). Hücrelerin glikoz kullanımını arttırdığı için diyabet tedavisinde de kullanılmaktadır (15). Spontan hipertansif ratlarda da kan basıncını düşürdüğü gözlenmiştir (16).

Tüm bu verilerin ışığında bu çalışmanın amacı; hipertansiyon ve diyabetin ayrı ayrı ve birlikte oluşturulduğu sıçanların böbrek dokusunda, lipoik asidin tedavi edici/hasar önleyici etkisinin immunohistokimyasal yöntem ile incelenmesidir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'undan 91/2005 nolu protokol numarası ile etik onay alındıktan sonra Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilen, Wistar cinsi toplam 56 erkek sıçan (250-300gr) kullanıldı. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20-22°C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi. Her

grupta 7 denek olacak şekilde 8 grup oluşturuldu. **I. grup; Kontrol:** Ab libutum beslenen hiçbir madde uygulanmayan grup, 8 hafta beklendi **II. grup; Diabetes Mellitus (DM):** İntraperitoneal (ip) yöntem ile 45 mg/kg Streptozotosin (STZ) uygulandı, 8 hafta beklendi (17). **III. grup; 5/6 Nefrektomi (5/6 Nf):** Sağ renal arterleri ligasyon yapılarak arter-venler bağlandı ve sağ böbrek çıkarıldı, 1/2 renal arter ligasyonu sağlandı. Sol renal arter-venlerin üçünden 2 tanesi ligasyon yapıldı ve toplam 5/6 renal arter ligasyonu sağlandı, 8 hafta süre ile beklendi (18). **IV grup; Lipoik asit (LA):** 45 mg/kg/gün LA 8 hafta süre ile oral gavaj yöntemiyle verildi (19). **V. grup; 5/6 Nefrektomi + Diabetes Mellitus (5/6 Nf+DM):** 5/6 nefrektomi modeli oluşturulduktan 3 hafta sonra 45 mg/kg STZ ile Diabetes Mellitus oluşturuldu ve 8 hafta daha beklendi. **VI. grup; Diabetes Mellitus+Lipoik asitin tedavi edici etkisi (DM+LAT):** İntraperitoneal (ip) yöntem ile 45 mg/kg STZ (S0130-1G, Sigma) ile Diabetes Mellitus oluşturuldu ve 8 hafta süre ile 45 mg/kg/gün LA (Sigma, St Louis, MO, USA) oral gavaj yöntemiyle verildi. **VII. grup; 5/6 Nefrektomi + Lipoik asitin tedavi edici etkisi (5/6 Nf+LAT):** 5/6 nefrektomi oluşturuldu ve 8 hafta süre ile 45 mg/kg/gün LA oral gavaj yöntemiyle verildi. **VIII. grup; 5/6 Nefrektomi + Diabetes Mellitus + Lipoik asitin tedavi edici etkisi (5/6Nf+DM+LAT):** 5/6 nefrektomi modeli oluşturulduktan 3 hafta sonra 45 mg/kg STZ ile Diabetes Mellitus oluşturuldu ve 8 hafta süre ile 45 mg/kg/gün LA oral gavaj yöntemiyle verildi.

STZ enjeksiyonundan önce deneklerin başlangıç ağırlıkları (gr) ve bazal kan glikoz değerleri (mg/dl) glukometre ile ölçüldü. Uygulamayı takip eden 3. günde, deneklerin kuyruk veninden alınan kan örnekleri glukometre (Accu-Chec Active, Roche) kullanılarak kan glikoz değerleri ölçüldü ve 250 mg/dl ve üzerinde bulunanlar diyabetik kabul edildi (17).

**Karotis arterden kan basıncı ölçümü:** Deneklere anestezi uygulanıp uyumaları sağlandıktan sonra karotis arterden ölçümün yapılacağı alana sabitlendiler. Trakea açılıp ile hava girişinin devamlılığını sağlamak amacıyla kanüle (PE 14 polietilen tüp) edildi. Ardından sistemik arteriyel basıncın ölçülebilmesi için sağ karotis arter kanüle edildi (PE 50 polietilen tüp). Arteriyel katater heparinize salin ile dolduruldu (250 U/ml) ve MP30, BPT

300 Transducer ile basınç ölçümü sağlandı (19). Her denek için 5 dakikalık ölçüm yapıldı ve programdan ortalamaları alındı.

**Histolojik İnceleme:** Deney sürelerinin sonunda elde edilen doku örnekleri %10'luk formalinde 24 - 48 saat fikse edildikten sonra rutin ışık mikroskopik doku takibinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Elde edilen bloklardan rotary mikrotom (RM 2255, Leica) ile 5 mikronluk kesitler alındı ve doku histolojisini incelemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskop ile incelendi.

**İmmunohistokimyasal yöntem (İHK):** İmmunohistokimyasal inceleme için Anti-anjiyotensin II tip 1 reseptör (AT1) (ab9391-1, Abcam), anti-Endotelin-1 (T-4050, Peninsula Laboratories), VEGF (sc-7269, Santa cruz) primer antikorları kullanıldı. Bu amaçla, deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Tripsin solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. Bloklama solüsyonu ile 1 saat inkübe edilen kesitler yapılmadan primer antikorlar ile 1 gece +4°C'de inkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor ve enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (İnvitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum Cat No:85-9043) ile muamele edildi Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) (1718096, Roche) kullanıldı. Zemin boyaması Harris hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı ve ışık mikroskop (Olympus DP70) ile incelendi.

**Biyokimyasal İnceleme:** 1 cc kandan elde edilen serum örneklerinde BUN ve Kreatinin değerleri spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü (Arcitect 16000).

**Verilerin istatistiksel analizi:** Çalışma sürecinde elde

edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Değerlendirmede ortalama, ve standart sapmalar belirlendi. Gruplar arası farklılık Kruskal Wallis ve One-Way ANOVA testi ile gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile, deney öncesi ve sonrası değerlerin karşılaştırılmasında Wilcoxon sıralı işaretler analiz edildi. Tüm sonuçlarda  $p < 0,05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

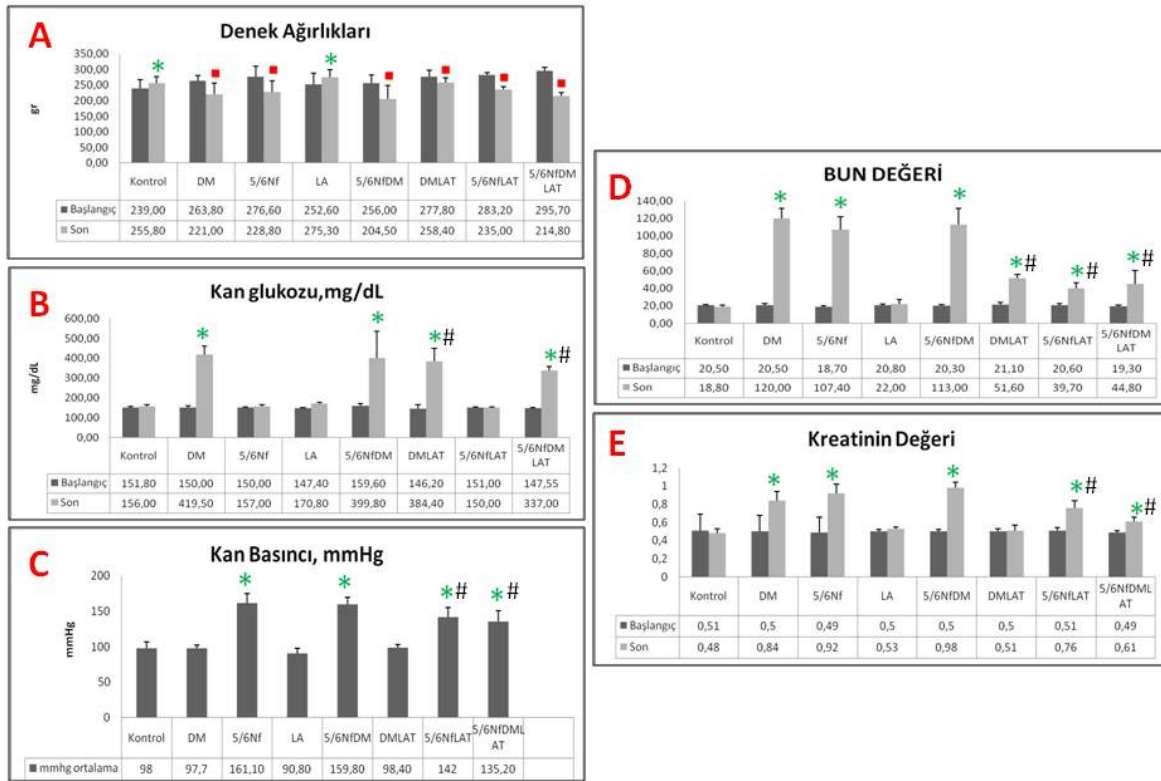
**İmmunohistokimyasal skorlama:** Semikantitatif yöntemle yapıldı. Tübülointersitisiyel ve glomerüler değerlendirilmede; **0:** boyanma yok, **1:** az boyanma, **2:** orta boyanma, **3:** şiddetli boyanma olarak değerlendirildi.

## BULGULAR

**Denek Ağırlıkları:** Deney başı ve deney sonu denek ağırlıkları değerlendirildiğinde kontrol ve LA grubunda anlamlı artış gözlenirken, diğer tüm gruplarda anlamlı azalma gözlemedi. (Kontrol  $p=0,018$ , DM  $p=0,005$ , 5/6Nf  $p=0,028$ , LA  $p=0,046$ , 5/6Nf+DM  $p=0,028$  DM+LAT  $p=0,018$  5/6Nf+LAT  $p=0,018$ ; 5/6Nf+DM +LAT  $p=0,018$ ) (Şekil 1A).

**Kan glikozunun değerlendirilmesi:** STZ ile diyabet oluşturulan gruplarda deney sonu değerleri deney başı değerlerine göre anlamlı olarak yükseldi. (DM  $p=0,005$ , 5/6Nf+DM  $p=0,028$ , DM+LAT  $p=0,018$ , 5/6Nf+DM+LAT  $p=0,018$ ). Diğer gruplarda anlamlı fark gözlenmedi. DMLAT ve 5/6Nf+DM+LAT grupları DM ve 5/6Nf+DM gruplarına göre anlamlı olarak azalmıştı ( $p < 0,05$ ) (Şekil 1B).

**Kan basıncının değerlendirilmesi:** Deney sonunda 5/6Nf, 5/6Nf+DM, 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT gruplarının kan basıncı değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0,00$ ). 5/6Nf ve 5/6Nf+DM grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmedi ( $p=1,00$ ). 5/6Nf ve 5/6Nf+LAT grupları karşılaştırıldığında 5/6Nf+LAT grubunda anlamlı düşüş olduğu ( $p=0,03$ ) ve 5/6Nf+DM ve 5/6Nf+DM+LAT grupları karşılaştırıldığında grubunda anlamlı düşüş olduğu ( $p=0,001$ ) gözlemedi (Şekil 1C).



**Şekil 1.** A'da Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıkları gösterilmekte \*: Anlamli artış, ■: Anlamli azalma. Wilcoxon Sıralı İşaretler Testi,  $p \leq 0,005$ . B'de deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu kan glikoz değerleri gösterilmekte. \*: Anlamli artış, #: Anlamli azalma,  $p \leq 0,005$ . C'de deney sonu karotis arterden KB ölçümleri gösterilmekte. \*: Anlamli artış, #: Anlamli azalma. D'de Deney başlangıcı ve sonu serum Bun değeri ölçümleri \*: Anlamli artış, #: Anlamli azalma,  $p < 0,005$ . E'de Deney sonu serum kreatinin ölçümleri \*: Anlamli artış, #: Anlamli azalma,  $p < 0,005$

**Biyokimyasal İnceleme:** Kontrol ve LA grubunun başlangıç ve deney sonu serum BUN düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı gözlenmezken diğer gruplarda anlamlı artış gözlemlendi (K  $p=0,144$ ; LA  $p=0,50$ ; DM  $p=0,043$ ; 5/6Nf  $p=0,043$ ; 5/6Nf+DM  $p=0,043$ ; DM+LAT  $p=0,03$ ; 5/6Nf+LAT  $p=0,018$ ; 5/6Nf+DM+LAT  $p=0,042$ ). Deneyel model ve tedavi gruplarını karşılaştırdığımızda ise; DMLAT grubunda DM grubuna göre anlamlı azalma ( $p=0,000$ ), 5/6Nf+LAT grubunda 5/6Nf grubuna göre anlamlı azalma ( $p=0,000$ ), 5/6Nf+DM+LAT grubunda 5/6Nf+DM grubuna göre anlamlı azalma olduğu saptandı ( $p=0,000$ ) (Şekil 1D).

Kontrol, LA ve DMLAT grubunun başlangıç ve deney sonu serum kreatinin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı gözlenmezken diğer gruplarda anlamlı artış gözlemlendi (K  $p=0,27$ ; LA  $p=0,102$ ; DM  $p=0,043$ ; 5/6Nf  $p=0,043$ ; 5/6Nf+DM  $p=0,043$ ; DM+LAT  $p=1,00$ ; 5/6Nf+LAT  $p=0,018$ ; 5/6Nf+DM+LAT  $p=0,042$ ). Deneyel model ve tedavi gruplarını karşılaştırdığımızda ise; DMLAT grubunda DM grubuna göre anlamlı azalma ( $p=0,000$ ), 5/6Nf+LAT grubunda 5/6Nf grubuna göre anlamlı azalma ( $p=0,001$ ), 5/6Nf+DM+LAT grubunda 5/6Nf+DM grubuna göre anlamlı azalma olduğu saptandı ( $p=0,000$ ) (Şekil 1E).

**İşık Mikroskopik Bulgular:** HE boyanmasında, kont-

rol grubunda korteks ve medullada normal histolojik yapı gözlemlendi. DM grubunda; kortekste glomerüller ve tübüler yapılarda kontrol grubuna göre dejeneratif etkilerin daha yoğun olduğu belirlendi. Glomerüllerin etrafında ve kapillerlerin etrafında mononükleer hücre infiltrasyonu, damarlarda dilatasyon, tübüllerde dilatasyon ve hiyalin materyal birikimi ile tübüler yapılarda dejenerasyon, kast formasyonu, proksimal tübül epitellerinde debris ve bazı glomerüllerde diffüz glomerülosklerotik yapılar görülmekteydi. 5/6Nf grubunda; 5/6Nf+DM grubunda; DM grubunda gözlenen bulgulara benzer bulgular gözlemlendi. LA grubunun kontrol grubuna benzer histolojik yapıya sahip olduğu belirlendi. DM+LAT; 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT gruplarında böbreğin dıştan fibröz bir kapsül ile sarılı olduğu, içte ise korteks ve medulla ayrımının yapıldığı gözlemlendi. Kortekste gözlenen renal korpusküllerin, proksimal ve distal tübüllerin histolojik yapılarını korudukları gözlemlendi.

**AT1 İmmunohistokimyası:** Kontrol, LA, DM+LAT, 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT grupları arasında tübülointerstisiyel ve glomerüller AT1 boyanmaları arasında

anlamli fark gözlenmedi ( $p>0,00$ ). DM, 5/6Nf ve 5/6Nf + DM grupları kontrol grubuna göre anlamli olarak yüksekti. DM grubu ve DM + LAT grubu karşılaştırıldığında DM+LAT grubu anlamli olarak düşüktü ( $p<0,05$ ). 5/6Nf grubu ve 5/6Nf+LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf+LAT grubu anlamli olarak düşüktü ( $p<0,05$ ). 5/6Nf+DM grubu ve 5/6Nf+DM+LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf+DM+LAT grubu anlamli olarak düşüktü ( $p<0,05$ ) (Tablo, Şekil 2).

**VEGF ve ET-1 İmmunohistokimyası:** Kontrol grubu ile LA, DM+LAT, 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT grupları arasında tübülointerstisiyel ve glomerüller VEGF boyanmaları arasında anlamli fark gözlenmedi ( $p>0,00$ ). DM, 5/6Nf ve 5/6Nf+DM grupları kontrol grubuna göre anlamli olarak yüksek olarak gözlemlendi ( $p<0,05$ ). DM grubu ve DM+LAT grubu karşılaştırıldığında DM+LAT grubu anlamli olarak düşüktü ( $p<0,05$ ). 5/6 Nf grubu ve 5/6Nf +LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf+LAT grubu anlamli olarak düşüktü ( $p<0,05$ ). 5/6 Nf+DM grubu ve 5/6Nf + DM+LAT grubu karşılaştırıldığında 5/6Nf + DM+LAT grubu anlamli olarak düşüktü ( $p<0,05$ ) (Tablo, Şekil 2).

**Tablo.** Böbrek kesitlerinin immunohistokimyasal olarak semikantitatif yöntem ile değerlendirilmesi

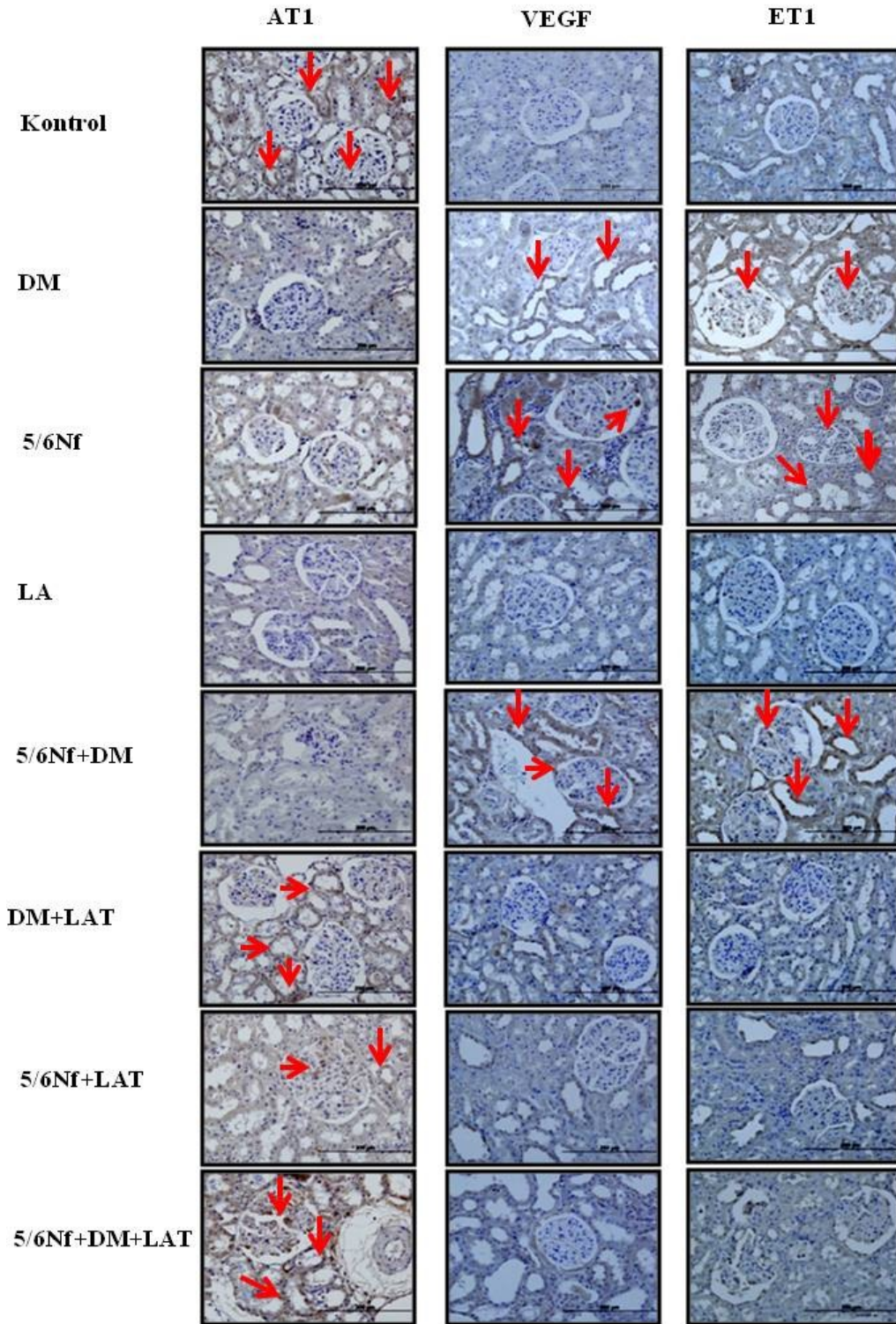
Gruplar	İmmunohistokimyasal Bulgular					
	AT1		VEGF		ET-1	
	Tübülointerstisiyel Alan	Glomerüller	Tübülointerstisiyel Alan	Glomerüller	Tübülointerstisiyel Alan	Glomerüller
Kontrol	1,87 ± 0,64	1,37 ± 0,51	0,87 ± 0,35	0,50 ± 0,53	0,50 ± 0,53	0,62 ± 0,51
DM	0,50 ± 0,54 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,40 <sup>a</sup>	2,50 ± 0,5 <sup>c</sup>	2,50 ± 0,54 <sup>c</sup>	2,50 ± 0,54 <sup>c</sup>	2,33 ± 0,51 <sup>c</sup>
5/6 Nf	0,57 ± 0,53 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,48 <sup>a</sup>	2,28 ± 0,48 <sup>c</sup>	2,57 ± 0,53 <sup>c</sup>	2,14 ± 0,37 <sup>c</sup>	2,42 ± 0,53 <sup>c</sup>
LA	1,71 ± 0,48	0,57 ± 0,53	0,71 ± 0,48	0,71 ± 0,48	0,42 ± 0,53	0,71 ± 0,48
DM+5/6Nf	0,71 ± 0,48 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,53 <sup>a</sup>	2,57 ± 0,53 <sup>c</sup>	2,42 ± 0,53 <sup>c</sup>	2,42 ± 0,53 <sup>c</sup>	2,28 ± 0,48 <sup>c</sup>
DM+LAT	1,57 ± 0,53 <sup>b</sup>	1,42 ± 0,53 <sup>b</sup>	1,14 ± 0,37 <sup>d</sup>	1,28 ± 0,48 <sup>d</sup>	1,28 ± 0,48 <sup>d</sup>	1,28 ± 0,48 <sup>d</sup>
5/6Nf+LAT	1,57 ± 0,53 <sup>b</sup>	1,28 ± 0,75 <sup>b</sup>	1,28 ± 0,48 <sup>d</sup>	1,28 ± 0,48 <sup>d</sup>	1,28 ± 0,75 <sup>d</sup>	1,42 ± 0,53 <sup>d</sup>
5/6Nf+DM+LAT	1,71 ± 0,48 <sup>b</sup>	1,14 ± 0,69 <sup>b</sup>	1,28 ± 0,48 <sup>d</sup>	1,28 ± 0,48 <sup>d</sup>	1,42 ± 0,53 <sup>d</sup>	1,28 ± 0,48 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>: Kontrol grubuna göre anlamli azalma ( $p<0,05$ ),

<sup>b</sup>: DM, 5/6Nf ve DM+5/6Nf gruplarına göre LA uygulanan gruplarda anlamli artış ( $p<0,05$ ),

<sup>c</sup>: Kontrol grubuna göre anlamli artış ( $p<0,05$ ),

<sup>d</sup>: DM, 5/6Nf ve DM+5/6Nf gruplarına göre LA uygulanan gruplarda anlamli azalma ( $p<0,05$ ),



Şekil 2. Deney gruplarına ait immunohistokimyasal AT1,VEGF ve ET1 boyanmaları görülmektedir. Kırmızı oklar artmış immüno-pozitif reaksiyonu göstermektedir.

## TARTIŞMA

Diyabetteki hipertansiyonun patogenezi kompleks ve multifaktoriyel olup tam olarak tanımlanmamıştır. Tip 2 diyabette nefropati gelişimi, kan basıncında meydana gelen daha sonraki artışlar ile ilişkilidir (20). Hipertansiyonun ise tek başına böbrek hasarı üzerine etkileri tartışmalı iken, diyabetik nefropati ve hipertansiyonun birlikte gözlemlendiği deneysel çalışmalarda glomerüloskleroz gelişimi artış göstermiştir (21). Bu çalışmada, deneysel olarak STZ ile diyabet modeli ve 5/6 nefrektomi ile hipertansiyon modellerinin ayrı ayrı ve birlikte oluşturulduğu sıçanlarda, LA'nın böbrek üzerindeki tedavi edici/hasarı önleyici etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Diyabetik komplikasyonların en belirgin özelliklerinden biri artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan savunma mekanizmasının varlığıdır. Diyabetin erken ve geç dönemlerinde artmış oksidatif stres nedeniyle renal korteksteki glomerüllerde, tübülointerstisyumda ve vasküler yapılarda ekstrasellüler matriks artışı, glomerüler filtrasyonda artış, glomerüloskleroz, tübülointerstisyel fibrozis ve proteinüride artış gözlenir. Günümüzde diyabetik nefropati gelişiminin kontrol edilebilmesi ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesindeki alternatif yollardan biri antioksidan kullanımıdır. Deneysel çalışmalardan birinde, Maritim ve ark. 90 mg/kg STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlara 14 gün süre ile LA tedavisi uygulamışlardır. Deneysel sonunda akciğer, kalp ve böbrek dokularında Süperoksit Dismutaz (SOD), katalaz, Glutasyon Peroksidaz (GSH), Glutasyon Redüktaz (GSSG) aktivitelerini incelemişlerdir. Sonuçta lipoik asitin serbest radikalleri süpürerek lipid peroksidasyonunu azaltarak oksidatif hasarı önleyici etkisini göstermişlerdir (22). Diğer bir çalışmada, LA'nın diyabetin erken dönemlerinde glomerüler hasarı, vitamin C ve E'nin yüksek dozlarından da fazla koruduğu gözlenmiştir (23). Bu çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda LA'nın tedavi edici etkisi değerlendirildiğinde, literatür ile uyumlu şekilde renal hasarın azaldığı, immunohistokimyasal boyama ile gözlemlenmiştir.

Hipertansiyon ve proteinüri böbrek hastalıklarının progresyonunda gözlenen major bileşenlerdir. Renal hasarın sonucunda glomerüler ve sistemik hipertansiyon, permeabilite, ve proteinüri gelişir. Bu durum nefron kaybı

ile devam eder (24). Bu patofizyolojik süreçte renal hasarı indirmek/önmek için çeşitli tedavi yaklaşımları geliştirilmiştir. Esansiyel hipertansif bireylerde antioksidan konsantrasyonunun düştüğü ve SOD aktivitesinin azaldığı, platelet ve nötrofillerde oksijen jenerasyonlarının artışı ve NO ürünlerinde azalma olduğu bildirilmiştir (25). Son dönemlerde antioksidanlar ile tedavide sıçanlarda ROS ürünlerinde azalma ve kan basıncında düşme gözlenmiştir (24-26). Bu çalışmada, kontrol ve lipoik asit uygulanan gruplarda böbrek yapısının korunduğunu gözlerken, diyabet ve nefrektomi uygulanan modellerde böbreğin parankima hasarının arttığı gözlemlendi. Lipoik asidin tedavi edici ve hasar önleyici etkisinin incelendiği gruplarda ise böbrek dokusunda tübüler, glomerüler ve intersitisiyel hasarların azaldığı ve lipoik asidin tedavi edici etkisinin olduğu belirlendi.

Diyabette, dolaşımdaki RAS baskılanırken, böbrek dokusundaki RAS sistemi aktive olur. Hiperglisemi sonucu indüklenen oksidatif stres, endotelial hasar, vazokonstriksiyon trombozisi, inflamasyon sonucunda dokuda anjiyotensin artışı gözlenir. Zimpelmann ve ark. STZ indüklü diyabetik sıçanlarda erken dönemde AT1 reseptörü protein ekspresyonu diyabetik grupta tüm kortikal ve proksimal tübüllerde azaldığını göstermişlerdir. Tübüler AT1 üretiminin lokal AII sentezi ile ilişkili olabileceğini düşünmüşlerdir (27). Mezzano ve ark.ları diyabetik nefropatili hastalardan aldıkları böbrek örneklerinde tübüler hücrelerde ve intersitisiyel hücrelerde AII'nin arttığını, AT1'in ise aynı hücrelerde azaldığını göstermişlerdir (28). Hsieh ve ark.ları ise kültür proksimal tübül hücrelerinde, antioksidan tedavisi ile ROS ürünlerini azaltarak glikoz indüklü anjiyotensin üretimini önleyebileceğini, böylece diyabetik nefropatinin önlenilebileceğini öne sürmüşlerdir (29). Bu çalışmada, literatür ile uyumlu şekilde kontrol grubunda artmış tübülointerstisiyel ve glomerüler AT1 immunohistokimyasal boyama ile gözlerken, diyabet oluşturulan gruplarında (DM, 5/6Nf+DM) tübülointerstisiyel ve glomerüler AT1'in immunohistokimyasal olarak azaldığını görüldü. LA tedavisi uygulanan gruplarda ise (DM+LAT ve 5/6Nf+ DM+LAT) AT1 immunoreaktivitesinin tübül ve glomerüllerde arttığını ve kontrol grubuna benzer immunopozitif boyanma özelliği gösterdiği gözlemlendi. Benzer şekilde,



Cao ve ark.ları subtotal nefrektomili sıçanlarda, AT1 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre düştüğünü, immunohistokimyasal olarak da AT1 reseptör proteininin glomerüllerde azaldığını bildirmişlerdir (30). Bu çalışmada, nefrektomi modeli uygulanan 5/6Nf grubunda AT1'in immunohistokimyasal olarak tübülointersitisiyel alan ve glomerüllerde kontrol grubuna göre azaldığını gözledik. LA'nın tedavi edici etkisinin değerlendirildiği 5/6Nf+LAT grubunda ise, AT1 immunorektivitesinin tübül ve glomerüllerde artışı ve kontrol grubuna yakın olduğu gözlemlendi.

Diabetes Mellitus PKC aktivasyonu, sitokin ve büyüme faktörlerinin aktivasyonu, renin anjiyotensin sisteminin aktivasyonu ve bunun sonucunda renal VEGF ürünlerinin artışı gibi birçok patolojik durum ile birlikte gözlenir. Cooper ve ark, diyabetik sıçanlarda glomerüllerde, distal ve toplayıcı tübüllerde VEGF mRNA ve protein düzeyinin kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir (31). Braun ve ark. spontan diyabetik sıçanlarda hastalığın başlarında böbrek dokusunda VEGF protein ve mRNA seviyelerinin arttığını göstermişlerdir (32). Kamba ve ark. podositlerde VEGF üretiminin azaltılmasını sağlayan genetik manipülasyonlu farelerde, glomerüler kapillerlerde endotelial fenestrasyon kaybı, glomerüler endotelial hücrelerde proliferasyon, podosit kaybı ve proteinürü olduğunu gözlemişlerdir (33). Bu çalışma da, bahsedilen çalışmalar ile paralellik göstermiş ve diyabet oluşturulan gruplarda glomerüler ve tübüler VEGF artışı DM+LAT grubunda ise VEGF'de azalma olduğu gözlenmiştir. Kelly ve ark.ları subtotal nefrektomi oluşturdukları sıçanlarda, glomerüloskleroz artışı ile VEGF artışında paralellik gözlemişlerdir (34). Bu çalışmada, literatür ile uyumlu şekilde nefrektomi uygulanan 5/6Nf ve 5/6Nf+DM grubunda kontrol ve LA grubuna göre VEGF ekspresyonunun arttığını, LA tedavisi uygulanan 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT gruplarında ise azaldığı belirlendi. Bu veriler bize, artmış fibrozis ve glomerüler genişlemenin VEGF ekspresyonu ile ilgili olabileceğini düşündürdü.

Diyabetik nefropatide ET1, mezangiyal hücre proliferasyonunu ve ekstrasellüler matriks üretimini indükleyen bir molekül olarak bilinmektedir. Sorakin ve Kohan ET1'in mezangiyal hücrelerde diyabetik nefropatide hiperglisemi nedeniyle artış gösterdiğini bil-

dirmişlerdir (35). Hung ve ark.ları, diyabetik böbrekte ET1'in ROS ürünlerini düzenlemedeki rolünü araştırmışlar ve süperoksit ve ET1 değerlerinde paralel bir artış gözlemişlerdir (36). Bu çalışmada da, benzer şekilde STZ diyabetik ratlarda ET1 seviyelerinin immunohistokimyasal olarak glomerüllerde ve tübül epitelinde arttığını görüldü. LA'nın ve etkisi uygulanan DM+LAT grubunda ise ET1 seviyelerinin azaldığını gözlemlendi.

ET1'in düşük dozlarda sistemik olarak uygulanmasında kan basıncında bir miktar artış gözlenmiştir (37). Deneysel modellerde ET1'in uzun süreli infüzyonunda inme ve renal hasar meydana geldiği bildirilmiştir (38). Sorakin ve Kohan hipertansiyonda ET1'in mezangiyal hücrelerde arttığını bildirmişlerdir (35). Lariviere ve Lebel ET1'in renal fonksiyonlarını değerlendirdikleri derleme çalışmalarında, renal yetmezlik ve glomerüler skleroz gösteren derecesiyle üriner ET1 atılımı arasında paralellik olduğunu bildirmişlerdir. ET1 kadar öncül maddesi olan preproET-1'in de renal hasarın gelişimi ile paralel olarak proksimal tübül epitelinde ve glomerüler hücrelerde artışı gözlenmiştir. Transgenik farelerde de ET1'in aşırı salınımının vasküler hipertrofi, interstisiyel fibrozis ve glomerülosklerozda artış gösterdiğini söylemişlerdir (39). Bu çalışmalar ile paralel şekilde bu çalışmada da nefrektomi ile hipertansiyon oluşturulan ratlarda ET1'in tübüler ve glomerüler olarak artış gösterdiğini, ve LA ile tedavi edilen 5/6Nf+LAT ve 5/6Nf+DM+LAT gruplarda ET1 seviyelerinin azaldığını gösterdik.

Sonuç olarak, histomorfometrik incelemeler sonucunda diyabetik sıçanlarda ve nefrektomi uygulanan sıçanlarda, kontrol grubuna göre oldukça fazla renal hasar olduğu gözlemlendi. Hipertansiyon ve diyabet modellerinin birlikte oluşturulduğu gruplarda renal hasarın progresyonunun hızlı ilerlediği belirlendi. Tübüler ve glomerüler AT1 azalması ile VEGF ve ET1 artışının tübülointersitisiyel ve glomerüler hipertrofi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. LA'nın hipertansiyon ve diyabet oluşturulan sıçanlarda böbrek üzerinde tedavi edici/hasar önleyici etkisinin olabileceği ve yeni teknikler ile bu bilgilerin desteklenmesi gerektiği düşünüldü.

## KAYNAKLAR

1. Bağrıaçık N. Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihçesi, Sınıf

- laması ve Sıklığı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Diyabetes Mellitus Sempozyumu, 9-18, 1997, İstanbul
2. Araz M. Diabetes Mellitus. In: Sağlık Y, Ed. İç Hastalıkları Prensipleri, 4. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2004; p. 2109-2123.
  3. Nolan CR, Schrier RW. Kidney in hypertension. In: Schrier RW editor. Renal and Electrolyte Disorders. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2005; 272-324.
  4. Williams B. Epidemiology and pathogenesis of hypertension in people with Diabetes Mellitus. In: Bryan Williams ed. Hypertension in diabetes. First Edition, London, New York, Martin Dunitz 2003; 3-24.
  5. Parlakpınar H, Yanılmaz M, Ağlamış S, Acet A. Kardiyovasküler sistem ve anjiyotensin II tip 2 reseptörü (AT<sub>2</sub>). İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2004; 11: 49-52.
  6. Neufeld G, Cohen T, Gengrnovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. The FASEB 1999; 13: 9-22.
  7. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, et al. VEGF<sub>145</sub> a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. J Biol Chem 1997; 272: 7151-58.
  8. Khimji A, Rockey DC. Endothelin-Biology and disease. Cell Signal 2010; 22: 1615-625.
  9. Benigni A, Perico N, Gaspari F, Zoja C. Increased renal endothelin production in rats with reduced renal mass. Am J Physiol 1991; 29: 331-339.
  10. Masharani U. Diabetes Mellitus & Hypoglisemia. In: McPhee SJ, Papadakis MA editors. Current Medical Diagnosis & Treatment. Forty-Eighth Editions. New York, McGraw Hill Medical 2009; 1053-1094.
  11. Jenette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG. Heptinstall's pathology of the kidney. 5th edition. Philadelphia. Lippincott-Raven 1998; 2: 943-1002.
  12. Alpha-lipoic acid. Alternative Medicine Review 2006; 11: 232-237.
  13. Snell EE, Strong FM, Peterson WH. Growth factors for bacteria. VI. Fractionation and properties of an accessory factor for acetic acid bacteria. Biochem J 1937; 31: 1789.
  14. Reed LJ, Gunsalus IC, Schnakenberg GHF, et al. Isolation, characterization and structure of  $\alpha$ -lipoic acid. JACS 1953; 75: 1267-1277.
  15. Eguíluz Lumbreras P, Hernández AP, Gómez Zancajo VR, et al. Nephrectomy in polycystic kidney disease before transplantation. Archivos Espanoles de Urologia 2010; 63: 403-409.
  16. Shore I, Moss J. Electronmicroscopy in diagnostic renal pathology. Current Diagnostic Pathology 2002; 8: 207-215.
  17. E. Guneli, K. Tugyan, H. Ozturk, M. Gumustekin, S. Cilaker, N. Uysal. Effect of Melatonin on Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetes Rats. Eur Surg Res 2008; 26: 354-360.
  18. Guray S, Sarioglu M, Turkmen O, et al. Cyclosporine A Toxicity in Association With Reduced Renal Mass. M. Transplantation Proceedings 2003; 35: 3128-3133.
  19. Cakatay U, Kayali R, Kiziler AR, Aydemir B. Postmitotic tissue selenium and manganese levels in alpha-lipoic acid-supplemented aged rats. Chemo-Biological Interactions 2008; 171: 306-311.
  20. Williams B. Epidemiology and pathogenesis of hypertension in people with Diabetes Mellitus. In: Bryan Williams ed. Hypertension in diabetes. First Edition, London, New York, Martin Dunitz. 2003; 3-24.
  21. Taal MW, Brenner BM. Evolving strategies for renoprotection: non-diabetic chronic renal disease. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2001; 10: 523-531.
  22. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Effects of  $\alpha$ -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Nutritional Biochemistry 2003; 14: 288-294.
  23. Özkan Y, Yılmaz Ö, Öztürk A, Erşan Y. Effects of triple antioxidant combination (vitamin E, vitamin C and  $\alpha$ -lipoic acid) with insulin on lipid and cholesterol levels and fatty acid composition of brain tissue in experimental diabetic and non-diabetic rats. Cell Biology International 2005; 29: 754-760.
  24. Cohuet G, Struijker-Boudier H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: Therapeutic potential. Pharmacology & Therapeutics 2006; 111: 81-98.
  25. Vasdev S, Gill V, Parai S, Gadag V. Dietary lipoic acid supplementation attenuates hypertension in Dahl salt sensitive rats. Molecular and Cellular Biochemistry 2005; 275: 135-141.
  26. Vasdev S, Ford CA, Parai S, Longereich L, Gadag V. Dietary alpha-lipoic acid supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens

- 2000; 18: 567- 573.
27. Zimpelmann J, Kumar D, Levine DZ, Wehbi G. Early Diabetes Mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat. *Kidney International*. 2000; 2320-30.
  28. Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Aros CA et al. Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney International*, 2003;64: 64-70.
  29. Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG, et al. High Glucose Stimulates Angiotensinogen Gene Expression via Reactive Oxygen Species Generation in Rat Kidney Proximal Tubular Cells. *Endocrinology* 2002;143:2975-2985.
  30. Cao Z, Bonnet F, Candido R, et al. Angiotensin type 2 receptor antagonism confers renal protection in a rat model of progressive renal injury *J Am Soc Nephrol* 2002;13: 1773-1787.
  31. Cooper M, Vranes D, Youssef S, et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR- 2 in experimental diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 2229–2239.
  32. Braun L, Kardon T, Reisz-Porszasz Z, Banhegy G. The regulation of the induction of vascular endothelial growth factor at the onset of diabetes in spontaneously diabetic rats. *Life Sciences* 2001;69:2533-2542.
  33. Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer* 2007; 96:1788-1795.
  34. Kelly D, Hepper C, Wu LL, Cox AJ, Gilbert RE. Vascular endothelial growth factor expression and glomerular endothelial cell loss in the remnant kidney model *Nephrol Dial Transplant* 2003;18: 1286-1292
  35. Sorakin A, Kohan DE. Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:579-589.
  36. Chen HC, Guh JH, Shin SJ, Tsai JH. Reactive oxygen species enhances endothelin-1 production of diabetic rat glomeruli in vitro and in vivo. *J Lab Clin Med* 2000;309-315.
  37. Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, Waldhausl W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation* 1990;81: 1415.
  38. Rubinstein I. Prolonged Anti-Hypertensive Effects of Oral Sitaxsentan, a Selective ET<sub>A</sub> Endothelin Receptor Antagonist, in Spontaneously Hypertensive Hamsters *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2006;20:387.
  39. Lariviere R, Lebel M. Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81: 607–621.