T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL OLARAK PARSİYEL UNİLATERAL ÜRETERAL OBSTRÜKSİYON OLUŞTURULAN RATLARDA BÖBREKTE ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN DÜZEYİNİN NİTRİK OKSİT DÜZEYİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hasan Anıl KURT

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Cabir ALAN

Çanakkale/2014

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Üroloji Anabilim Dalı uzmanlık eğitimi
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Dr. Hasan Anıl KURT' a Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20.05.2014

TEZ KONU BAŞLIĞI

"DENEYSEL OLARAK PARSİYEL UNİLATERAL ÜRETERAL OBSTRÜKSİYON OLUŞTURULAN RATLARDA BÖBREKTE ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN DÜZEYİNİN NİTRİK OKSİT DÜZEYİNE ETKİLERİ"

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Cabir ALAN

Tez Jürisi Üyeleri:

Adı Soyadı	**İmzası**
Prof.Dr. Ahmet Reşit ERSAY	.....
Prof.Dr. Murat TUNÇ	.....
Doç.Dr. Cabir ALAN	.....

ONAY:

Bu tez Anabilim/Bilim Dalı Akademik Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulunun 28./05./2014 tarih ve 2014/15.. sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

.....
Dekan
Prof. Dr. Hüseyin ÖZDEMİR
ÇOMÜ Tıp Fakültesi
DEKAN

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresi boyunca her gün işime severek gelmemi ve her zaman istekle çalışmamı sağlayan sağlayan uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof.Dr. Ahmet Reşit ERSAY'a,

Çalışmamın her anında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, asistanlığım süresince tecrübesi ve fikirleriyle beni destekleyen ve yönlendiren, her sorunumda mutlaka değerli zamanını ayıran, tez danışmanım Doç.Dr. Cabir ALAN'a,

Tezimin yapılma aşamasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Bahadır KIRILMAZ ve Doç. Dr. Dilek Ülker ÇAKIR'a,

Asistanlık sürecini paylaştığım, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, tüm hocalarıma ve bölümümüzden mezun olmuş, halen asistan olarak görev yapan arkadaşlarıma,

Beraber çalışma mutluluğunu yaşadığım tüm hemşire ve personel arkadaşlara,

Zorlu doktorluk hayatımın her anında kahrımı sırtlayan, her zaman pozitif enerjisiyle yeni güçlükleri aşmamda fedakâr davranan, biricik oğlum Sarper'in dünyaya gelmesi ve yetişmesi gibi zor görevi üstlenen ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim'e,

İlkokuldan bugüne kadar eğitimime ve hayatıma sürekli destek olup her türlü fedakârlıkta bulunan canım anneme ve tüm aileme,

Teşekkür ederim…

İÇİNDEKİLER

DİZİN **Sayfa No:**

İç Kapak i
Kabul-Onay Sayfası ii
Teşekkür iii
İçindekiler iv
Özet vi
İngilizce Özet vii
1.Amaç 1
2.Genel Bilgiler 3
2.1 Embriyoloji 3
2.2 Anatomi 6
2.3 Obstrüktif Nefropati 14
2.3.1 Unilateral Üreteral Obstrüksiyon Modelinde Tübüler Değişiklikler....16
2.3.2 Unilateral Üreteral Obstrüksiyon Modelinde Fizyolojik Değişiklikler...18
2.3.3 Hayvan Modellerinde Obstrüktif Nefropati 19
2.4 Oksidatif Stres..... 20
2.4.1 Serbest Radikaller ve Oksidanlar.....21
2.4.2 Serbest Radikal Reaksiyonları.....22
2.4.3 Serbest Oksijen Radikalleri.....23
2.4.4 Süperoksit Radikalleri.....27
2.4.5 Süperoksit Dismutaz (SOD).....27
2.4.6 Oksidatif Stres ve Antioksidan Enzimlerin Böbrek Üzerine Etkileri...28
2.5 Nitrik Oksit (NO).....30
2.5.1 Nitrik Oksit'in Fizyolojik ve Patolojik Etkileri.....31
2.5.2 Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri ve Özellikleri.....33
2.5.3 Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörleri.....34
2.5.4 Nitrik Oksit Ölçümü.....35
2.5.5 Nitrik Oksit ve Böbrekler.....35
2.6 Metil Arjininler.....37
2.6.1 Metil Arjininlerin Oluşum ve Çeşitleri 37
2.6.2 Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA) 39

2.6.2.1 ADMA Metabolizması.....40
2.6.2.2 ADMA ve Böbrekler.....43

3.Materyal ve Metod 46
3.1 Deney Hayvanları 46
3.2 Cerrahi İşlem 47
3.3 Biyokimyasal İnceleme Yöntemi 51
3.4 Histopatolojik İnceleme 61
4.Bulgular 64
5.Tartışma 67
6.Kaynaklar 75

ÖZET

Amaç

Üreteral obstrüksiyona bağlı olarak gelişen retrograd glomerüler reflü sonucu nitrik oksit sentezinin bozulduğu ve buna bağlı olarak da böbrek fonksiyonlarının etkilendiği birçok deneysel çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca nitrik oksit sentaz inhibitörü olan asimetrik dimetil arjininin retrograd glomerüler reflüye bağlı olarak arttığı ve nitric oksit sentezini bozduğu bilinmektedir. Amacımız tek taraflı akut üreteral obstrüksiyon modeli oluşturulan ratlardaki asimetrik dimetil arjinin ve nitrik oksit düzeyleri ölçülerek, bunların böbrek üzerindeki etkileri araştırmaktır.

Materyal Metod

Çalışmaya ağırlıkları 240-290 gr arasında değişen 21 adet adolesan dönemdeki (ortalama 6 haftalık) Spraque-Dawley tipi erkek sıçanlar alındı ve rastgele olarak 3 gruba ayrıldılar. Grup 1: Kontrol grubu (n=6): Herhangi bir işleme tabi tutulmadı. Grup 2: Sham grubu (n=6): Deney grubu ile aynı işlem yapılıp üreter ve psoas kas diseksiyonu uygulanmayan grup. Grup 3: Parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon oluşturulan grup (9 rat). Tüm ratlar 12 hafta sonra sakrifiye edildi. Böbrek dokusunda Superoksit Dismutaz enzim aktivitesi ile nitrit ve nitrat tuzlarının düzeyleri saptandı. Plazma nitrit-nitrat ve ADMA düzeyleri çalışıldı.

Bulgular

Deney grubu doku SOD ve kan ADMA düzeyleri kontrol ve sham grubuna göre belirgin yüksek ($p<0,05$), deney grubundaki doku NO ve plazma NO değerlerinin ise sham ve kontrol grubuna göre belirgin düşük olduğu görüldü ($p<0,05$).

Sonuç

Obstrüktif nefropati sonrası gelişen renal komplikasyonları önlemek için ADMA'yı azaltma yönündeki çalışmalar, yeni stratejilerden biri olabilir diye düşünüyoruz.

ABSTRACT

Aim

As a result of retrograde glomerular reflux developing linked to ureteral obstruction, nitric oxide synthesis is disrupted and the effect of this on renal function has been shown by many experimental studies. In addition asymmetric dimethyl arginine, a nitric oxide synthesis inhibitor, increases due to retrograde glomerular reflux and is known to disrupt nitric oxide synthesis. Our aim is to measure asymmetric dimethyl arginine and nitric oxide levels in rats with induced unilateral acute ureteral obstruction to research the effects on the kidney.

Material and Methods

The study included 21 adolescent (average age 6 weeks) Sprague-Dawley male rats weighing between 240-290 g divided at random into 3 groups. Group 1: Control group (n=6): underwent no procedures. Group 2: Sham group (n=6): underwent the same procedures as the experimental group without ureter and psoas muscle dissection. Group 3: Group with induced partial unilateral ureteral obstruction (n=9). All rats were sacrificed after 12 weeks. Superoxide dismutase enzyme activity and nitrite and nitrate salt levels were measured in renal tissue. Plasma nitrite-nitrate and ADMA levels were examined.

Results

In the experimental group tissue SOD and blood ADMA levels were significantly high compared to the control and sham groups ($p<0.05$) while tissue NO and plasma NO values were significantly lower than in the sham and control groups ($p<0.05$).

Conclusion

To prevent renal complications developing after obstructive nephropathy we believe that a new strategy may be research on reducing ADMA. But more extensive experimental and clinical studies are needed.

Deneysel Olarak Parsiyel Unilateral Üreteral Obstrüksiyon Oluşturulan Ratlarda Böbrekte Asimetrik Dimetil Arjinin Düzeyinin Nitrik Oksit Düzeyine Etkileri

1- AMAÇ

Böbreklerde normal fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesinde Nitrik Oksit'in (NO) önemi büyüktür. NO böbreklerde renal arterler, makula densa, glomerüller ve tübülüslerden salgılanabilmektedir. NO renal kan akımı, renal otoregülasyon, tübüloglomerüler 'feedback', renin salınımı, natriüretikler ve tübüler fonksiyonların fizyolojisinde rol alır. Arteryal kan basıncının artmasıyla endotelyal NO salınımı artmakta ve böbrek tübülleri direkt etkilenerek, sodyum reabsorbsiyonu inhibe olmaktadır. NO renin salınımı üzerine başlangıçta inhibitör etki gösterirken, uzun süreli NO etkisiyle karşılaşma sonrasında bu etki tam tersi stimülasyon şeklinde olabilmektedir. Böbrekte NO sentezi bozulduğunda böbrek fonksiyonlarının etkilendiği birçok çalışma ile gösterilmiştir.

Üreteral obstrüksiyonlar, üroloji pratiğinde sıkça rastlanılan ve erken dönemde tedavi edilmediğinde ciddi komplikasyonlara neden olan bir durumdur. Yapılan birçok deneysel çalışmada üreteral obstrüksiyona bağlı olarak gelişen retrograd glomerüler reflü sonucu NO sentezinin bozulduğu ve buna paralel olarak da böbrek fonksiyonlarının etkilendiği gösterilmiştir. Bununla birlikte NO sentezinin neden ve hangi mekanizmayla bozulduğu hala tam olarak bilinmemektedir.

Asimetrik dimetil arjinin (ADMA), nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörüdür. NOS'un vücuttaki fonksiyonu L-Arjinin'den NO sentezini sağlamaktır. Vasküler endotelde gerçekleşen bu reaksiyonda ADMA, NOS aktivitesini inhibe ederek L-Arjinin'in hücre içine alımını engeller. Yani ADMA, NO oluşum hızını düzenler. Bozulan endotel bağımlı vazodilatasyon, plateletlerin agregabilite artışı ve

monosit adezyonu artışının klinik delili olarak ortaya çıkan endotel disfonksiyonu, ADMA artışını uyarır. Üreteral obstrüksiyonda retrograd glomerüler reflüye bağlı olarak böbrek parankiminde inflamasyon mediatörlerinde artış olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu durum ADMA sentezinde artışa neden olarak NO sentezinde bozulmaya, buda böbrek fonksiyonlarının etkilenmesine neden olabilir. Nitekim 221 kronik böbrek yetmezliği olan bir hasta grubunda yapılan bir çalışmada, serum ADMA düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada ratlarda tek taraflı akut üreteral obstrüksiyon modeli oluşturularak böbrekteki ADMA düzeyi ve NO düzeyleri ölçülerek, bunların böbrek üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

2- GENEL BİLGİLER

2.1 EMBRİYOLOJİ

Memeli böbrekleri epitelial ve mezenkimal progenitör dokuların karşılıklı etkileşimi sonucunda gelişir. İdrarı oluşturan böbreklerle idrar atılımını sağlayan üreter, mesane ve üretranın gelişimi farklıdır (1).

Böbrekler insanda definitif böbrek halinde taslaklanmayıp esas böbreğe öncülük etmek üzere embriyoner yaşamda önce baş - boyun bölgesinde pronefroz oluşturmaktadır. Pronefroz sadece bazı primitif amnionlu vertebralılarda üropoetik fonksiyona sahiptir ve 6-10 çift tubüliden ibarettir. Bunun arkasından gövde bölgesinde mesonefroz oluşmaya başlar. İnsanda belirli bir büyüklüğe ulaşır ve 4-8 haftadaki erken embriyonik yaşamın başlıca ekskretuar organıdır.

Bunun yerine amnionluların embriyonlarında daha arkada kaudal tarafta 3. organ halinde metanefroz, asıl definitif böbrek halini almaktadır (2). Birbiri ardına gelişen pronefroz, mesonefroz ve metanefrozun üropoetik kısmına ait gelişimi aynıdır ve somitleri yan plaklara bağlayan dar ve boru şeklindeki somit saplarından (nefrotom) yani mesoderme ait olan ürogenital plaktan kaynaklanırlar (2).

İnsanda intrauterin yaşamın 5. haftası civarında üreteral tomurcuk, divertikül formunda mesonefrik kanalın kaudal segmentinden kloakanın yanında gelişir. Üreteral tomurcuk sefalik pozisyonda metanefrik blasteme penetre olur, dallara ayrılarak renal pelvis, majör ve minör kaliks kollektör tüpler ve üreteri oluşturur (1).

Kollektör tubüller, pelvis renalis ve üreter, Wolf kanalının yaptığı üreter tomurcuğundan orijin alırken, idrarı hazırlayan kısımlar yani Bowman kapsülü,

tubuli kontorti, henle kulpu ve nefronlar ise mesonefroz blastemin devamı olan metanefrojen dokudan gelişirler (1).

Üreter tomurcuğunun son kısmı genişleyerek propelvisi oluştururken diğer kısmı ise sap gibi uzayarak üreter taslağını yapar. Propelvisten; pelvis renalis, kalixler ve kollektor tubuliler meydana gelir. Üreter tomurcuğunun üzerine oturan metanefrozun doku kitlesi üreter tomurcuğunun stimulasyonu ile genişler. Bu metanefrojen manto da periferik dış tabaka ile böbrek parankiminin bağ dokusu kısmını iç tabaka da nefronların epiteliyal kısımlarını meydana getirir. Propelvisten 6 esas tubüli (Ductus Renkulares) oluşturmakta ve bunların da ağaç gibi dallanmasıyla kollektür tubuliler gelişmektedir. Her bir ağaç sistemi kendisine ait olan metanefrojen doku ile birlikte bir ünite oluşturur ve böylece 6 esas primitif renkulus oluşur (1).

Bütün bu embriyolojik gelişim süreciyle birlikte üreterik tomurcuğun ya da metanefrozun anormal farklılaşması beraberinde çeşitli konjenital renal ve kollektör sistem anomalilerine neden olur (3).

Üreter 6. gestasyon haftasında solid doku formundadır ve midüreteral segment ile başlayan kanalizasyon genişleyerek devam eder. Obstrüksiyon ve rekanalizasyon proçesinde seviye bu nedenle midüreteral düzeydedir (4).
Bazı araştırıcılar ÜPB ve üreterovezikal bileşke (UVB) obstrüksiyonlarının üreter gelişiminin sefalokaudal inkomplet rekanalizasyonun sonucunda meydana gelebildiğini speküle etmişlerdir. ÜPB ve ÜVB son kanalize olan segmentlerdir. Bunların kanalizasyonu sırasında gelişen membranların (Ostling-Chwalle) kaybolmasının geçikmesi hidronefroza veya hidroüreteronefroza yol açabilirler. Metanefrik idrar oluşumu bu sürede görülmediği gibi düz kas differansiasyonun histolojik kanıtıda bulunmaz (4). Düz kas hücre belirtileri ilk kez ÜVB yanında görülür ve zincirleme olarak retrograd yönde UPB'ye doğru ilerler (5). İnsan fetusunda, düz kas hücre farklılaşmasının farkedilebilir ilk kanıtları 7. Gestasyon haftasında mesanede görülür ve 16. haftada üst üriner kas yapısında da belirmeye başlar (6).

İntrauterin 10.haftada nefron matüre hale gelir ve idrar yapımı başlar. Sodyum ve üre konsantrasyonu ise 12 - 14. haftada başlar. Amniyotik sıvının tamamı 18. haftadan sonra fetal idrardan yapılmaya başlanır. Amniyotik sıvı volümünün devamlılığını sağlama kabiliyeti bu nedenle fetusun büyüme ve gelişmesinden 18.haftadan itibaren etkilenmeye başlar. Diğer yandan gelişimi süren glomerül 36. haftada differansiyasyonunu tamamlar (7).

Üreter tomurcuğunun faklılaşmasının intrarenal - extrarenal bölümler arası geçiş zonunda prematür duraklaması ÜPB'ye yakın aperistaltik üreteral segmentin oluşmasına yol açar. Fetal üreter relatif olarak uzun ve tortuoz yapıdadır. Vücut büyümesiyle ve üst retroperitoneal bölumde böbreğin yükselişi ile geç olsa da düzleşir. Fetal kıvrımların ve tortuozitenin persiste edişi sonucu olan konjenital üreteral obstrüksiyon, Ostling valv ile açıklanabilir (8).

Normalde ÜPB'nin luminal çapı fetusta olduğu gibi erişkinde de istirahat halindeki üreterin çapından daha küçüktür (9). Düz kas hücrelerinin sayısı ÜPB'nin gelişimi süresince sürekli olarak azalır (21). Klinik olarak UPB darlığı bu bölgede var olan normal darlığın anlamlı patolojik sonucu yüzünden olabilir.

Genetik spesifik rekombinasyon mühendisliği sayesinde ÜPB obstrüksiyonundaki patoloji ortaya çıkarılmaya çalışılmaktadır (10,11,12). Temel olarak doğumsal bir anomali olmakla birlikte olguların ancak %25' inde tanı yaşamın ilk yılında, %50'sinde ise 5 yaştan önce konulabilmektedir (20). Günümüzde prenatal sonografinin gelişmesi ile üst üriner sistemin dilatasyon ve kistik değişikliklere neden olan konjenital üropatilerin tanımlanması mümkün olmuştur.

Bu tür hastaların çoğunluğunda prenatal dönemde girişimlerde bulunulmadığı gibi, postnatal dönemde üriner sistemdeki parsiyel obstruksiyon sonucu oluşan hidronefrozun uzun süreli izlenimlerde böbrek fonksiyonlarını bozmadan spontan olarak düzelmekte ve genelde olumsuz bir etki bırakmamaktadır (19).

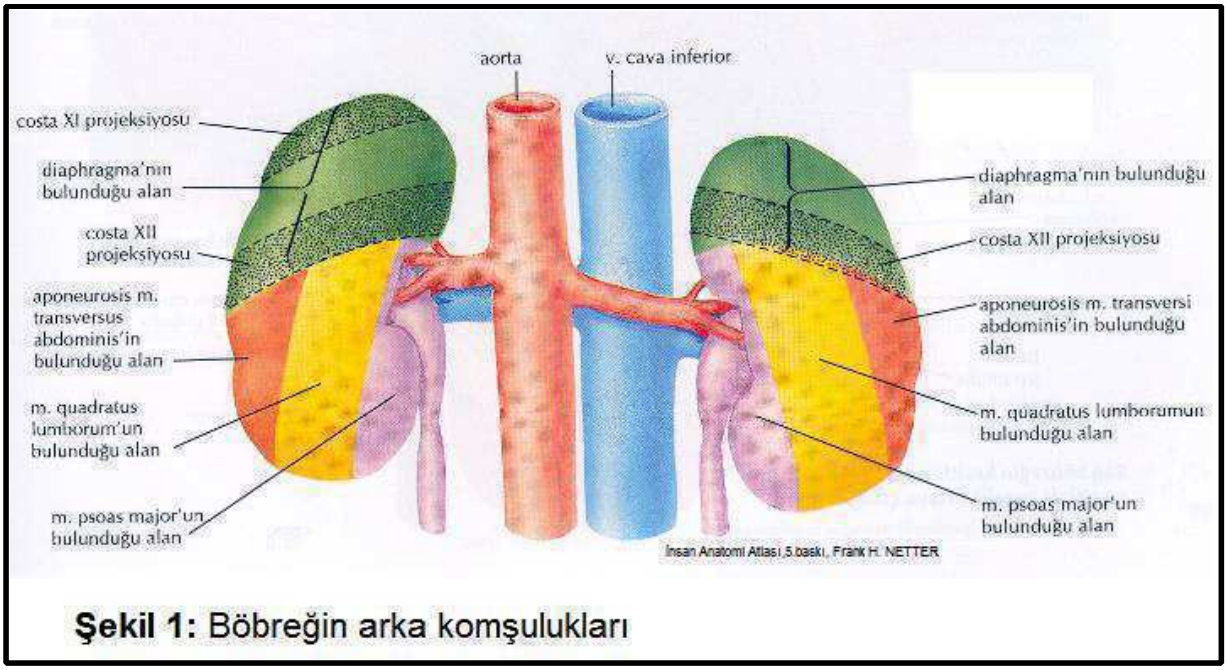
Prenatal ürogenital sisteme ait patolojilerin %21–87'sinde tanı hidronefroz olarak karşımıza çıkmaktadır (13,14,15). Hayatın ilk yıllarında ortaya çıkan ve prenatal tespit edilen hidronefrozun her zaman obstruksiyonla birlikte olmadığı, bunların bir kısmının non–obstruktif dilatasyon olduğu bilinmektedir. Non-obstruktif hidronefroza sahip olgulardaki dilatasyonun herhangi bir girişime gerek duymaksızın kendiliğinden kaybolduğu bilinen bir gerçektir (16). Prenatal tanı konulan UPB darlıklarının yaklaşık %50'sinde operasyon gerekli görülmektedir (17,18).

Obstruktif dilatasyonların, obstruktif olmayanlardan ayrılabilmesi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu ayrımın yapılması; renal fonksiyonların korunması ve hastayı gereksiz operasyon riskinden kurtarabilir.

2.2 ANATOMİ

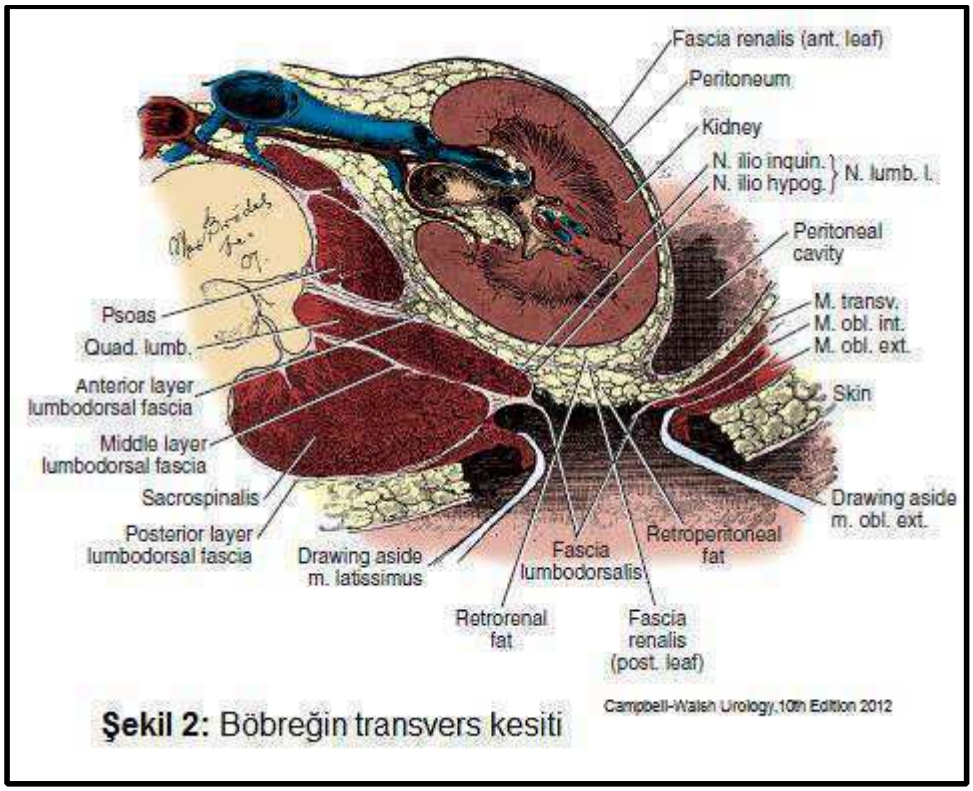
Üriner sistem idrarı oluşturan renal parankim, idrarı mesaneye ileten üreterler, bu idrarı biriktiren mesane ve vücuttan atılımını sağlayan üretradan oluşur. Böbrekler karın arka duvarının üst kısmında ve vertebral kolonun her iki yanında bulunur. Erkeklerde 150 gram, kadınlarda ise 135 gramdır. Sağ böbreğin üst ucu T12 vertebra seviyesinde, sol böbreğin ise T11 vertebra seviyesindedir. Alt uçları L3 vertebra seviyesinde, crista iliaca'dan 2,5 cm yukarıdadır. Karaciğer nedeniyle sağ böbrek soldakinden yaklaşık 2 cm daha aşağıdadır. Sağ böbreğin ön yüzü suprarenal bez, karaciğerin sağ lobu, çıkan kolon, sağ fleksura, duedonumunun ikinci parçası (pars descendens) ve jejunum kıvrımları ile komşudur. Karaciğer ve ince barsakla komşu alanları peritonla örtülüyken, diğer organlarla komşu olduğu alanlar peritonsuzdur. Sol böbreğin ön yüzü, suprarenal bez, dalak, mide, pankreas gövdesi, splenik damarlar, sol fleksura, inen kolonun başlangıcı ve jejunum kıvrımları ile komşuluk yapar. Mide, dalak ve jejunumun komşu olduğu bölgeler peritonla örtülüyken; suprarenal bez, pankreas ve sol fleksura'nın komşu olduğu alanlar peritonsuzdur. Böbreklerin üst ve iç yüzleri, glandula suprarenalis ile komşudur.

Böbreklerin arka yüzleri diyafragma, m.psoas major, m.quadratus lumborum, m.transversus abdominis, subkostal ven-arter-sinir, n.iliohypogastricus ve n.ilioinguinalisle komşudur. Kostodiafragmatik açı ile de küçük bir bölümü komşuluk yapar.



Şekil 1: Böbreğin arka komşulukları

Böbrekleri yerinde tutan en önemli oluşumlar, damarları ve fasya renalistir. Böbrekler bazı durumlarda aşağı-yukarı yönde hareket edebilirler. Üst yarılarının diyafragmaya yaslanması nedeniyle, derin inspirasyonda 1-2 cm aşağı inerler. Böbreklerin pozisyonu etraf dokular tarafından etkilenmektedir. Üst pol, alt pole oranla daha medialde ve posteriordadır. Böbreğin medial yüzü lateral yüzüne göre daha anterior planda yer almaktadır. Gerota fasyası perirenal yağlı dokuyu ve böbreği sarmaktadır. Lateral ve süperior alanlarda kapalı iken mediali kontrolateral tarafla kaynaşmaktadır. İnferior alanda ise gerota fasyası açıktır (22,23).



Şekil 2: Böbreğin transvers kesiti

Böbreğin vasküler pedikülü, klasik olarak renal hilumun mediali yoluyla böbreğe giren kalın bir ven ve tek arter (%70) ile tanımlanır. Hilusa giren yapılar anteriordan posteriora doğru olmak üzere sırasıyla ven, arter ve renal pelvistir (24).

Sağ renal arter sola göre daha yukarıda olmak üzere renal arterler aortadan çıkmaktadır. Sağ renal arter V. Cava inferior (VCİ)un arkasından geçtiği için sola göre daha uzundur. Renal arterin küçük superior kolu adrenal glandı, küçük inferior kolu da pelvis ve üst üreteri besler. Minik arteriel dalları ise renal kapsül ve perinefritik yağlı dokuyu besler. Renal arter tipik olarak 4 veya daha fazla segmenter damara ayrılır. Genellikle renal hiluma girmeden önce renal arterden ayrılarak posteriorda pelvis ve böbreğin posterior segmentinin büyük kısmını besleyen dal, en değişmez bölüm olan posterior segmenter arterdir. Diğer segmental arterler (apikal, üst, orta ve alt) ana renal arterden renal hiluma girdikten sonra dal alırlar. Bu segmenter dağılım böbreğin posterolateral bölümünde avasküler bir çizgi oluşturur. (Brödel hattı). Bu çizgi dış yüzde pelvisin alt giriş noktasına döner ve Gilvernet'in genişletilmiş pyelonefrotomi girişimi bu bölgeden yapılan insizyonla gerçekleştirilir (24,25).

Segmenter arteri takip eden multiplkollardaki arterler end-arterlerdir. Anastomoz veya kollateral dolaşımları olmadığı için bu damarların oklüzyonu ile iskemi ve infarktlar oluşur. Renal parankimin beslenmesinin tamamen etkilenmesi için ana renal arterin böbreğe girişinde dallanmadan önce zarar görmesi gerekir (24). Segmenter arterler renal sinüsten sonra lobar, renal parankime girişte de interlobar arterler olarak tekrar ayrılırlar. Bertini columnaları ve piramidleri arasındaki bileşkede dışa doğru radyal olarak uzanırlar.

Arteryal dalların seyri minör kalixlerin infındibulumu ile birlikte genellikle biter. Alt anterior segmenter arter genellikle ÜPB'nin anterior yüzünü çaprazlarken, nadiren de posterior segmenter arter ÜPB'yi posteriordan çaprazlayabilir. Bu nedenle UPB darlığı ameliyatlarında iatrojenik vasküler yaralanmalar daha sık bu segmenter arterlerde olur.

Piramidin tabanında interlober arterler arkuat arter olarak dallanırlar ve arkuat arterler de multipl radial dallarla interlobuler arterler olarak seyrederler. Interlobuler arterler afferent arteriolle glomerüle gelir. Glomerül; üriner filtratın arteriel sistemden ayrıldığı, her böbrekte yaklaşık iki milyon adet bulunan ince geçirgen kapillerlerden oluşan küresel şebekelerdir.

Kan glomerül kapiller yumağı efferent arteriol yoluyla terkeder ki; burası afferent arteriolün glomerüle giriş yerinin yanındadır. Efferent arterioller, kortexteki üriner tubuller etrafında sekonder kapiller ağ oluştururlar ve vasa rekta adı altında vasküler looplar şeklinde renal medullanın içine, toplayıcı sisteme doğru uzanırlar (24).

Renal arter ve venin varyasyonları %25-40 oranında görülür. En sık görülen tip aksesuar renal arterdir (genellikle 2 veya 3 adet). Bunlar ana arterin alt ya da üstünde ve ona paralel uzanarak hiluma girerler. Ancak bazı aksesuar arterler alt ya da daha sık olarak üst kutba doğrudan girebilirler. Nadiren ve daha sıklıkla ektopik böbreklerde çöliak plexus, superior mezenterik arter ve iliak arterlerden aksesuar dallar gelebilir. Alt kutba giden aksesuar arterler ÜPB'yi çaprazlayarak doğumsal darlık izlenimi verirler. Sağ alt pol aberran arteri VCI'u daha çok superiordan çaprazlar (24,25).

Böbrekler T12 - L2 seviyesinden gelen renal plexusdan innerve olmaktadır. Bu plexusa çöliak ve aortikorenal ganglionlardan ve alt torasik sinirler ile aorta ve alt splanknik sinirlerden dallar gelmektedir. Renal plexustan gelen otonom sinirler renal arteri takip ederek böbrek hilusuna girerek pelvis, kalixler ve parankime dallar verirler. Böbrek kortexi ve kapsül civarından çıkan afferent lifler ise sempatik liflerle T11 - L2 düzeyine ulaşırken çok az bir bölümü de vagus yoluyla aynı yolu izler.

Böbreğin otonomik afferent lifleri inguinal ve femoral bölgeden gelen somatik lifler ile aynı yerden spinal korda girdiklerinden, ağrı sıklıkla subkostal bölge ve alt abdomene yayılır. Renal kapsülün ani gerilmesine neden olan patolojilerde ağrının olması kadar, kronik olaylarda (kronik üreteral obstrüksiyona bağlı hidronefrozlarda) ağrının az ya da hiç olmaması da önemlidir (24).

Böbrek kesit yüzeyi incelendiğinde, renk ve fonksiyon bakımından farklı iki bölümden oluştuğunu görürüz. Açık renkli dış kısmına korteks renalis, daha koyu renkli ve çizgili görünümlü olan iç kısmına ise medulla renalis denilir. Orta kısımdaki boşluğa sinus renalis denilir. Korteks renalis kökenini nefrojen dokudan alır ve idrar süzen yapılar ihtiva eder. Medulla renalis ise kökenini üreter tomurcuğundan alır ve toplayıcı kanallardan oluşur.

Hilum renalenin böbrek içersinde devam ettiği boşluğa sinüs renalis denir. Sinüs renaliste pelvis renalisin üst bölümü, kaliks renalisler, böbrek damarları ve bunlar arasındaki yağ dokusu bulunur. Böbreği saran fibröz kapsül, hilum renaleden girerek sinüs renalisin iç yüzünü döşer ve pelvis renalisin dış yüzünde devam eder. Böbreğin süzdüğü idrar, bir böbrekte toplam olarak bulunan 116-776 adet papilla renalisler üzerindeki deliklerden (forniks papillare) sayıları 4 ila 14 adet olan minör kalikslere dökülür. Minör kaliksler ise 1-3 papilla içerir. İki ya da üç minör kaliks birleşerek bir adet major kaliksi, bunlar da kendi aralarında birleşerek renal pelvisi oluşturur. Kalikslerin duvarında bulunan spiral şekilli kas liflerinin kontraksiyonu sonucunda idrar aşağı doğru iletilir. Pelvis renalis, böbrekten çıkarken birden daralarak üreteri oluşturur (22,23).

Üreter dışta fibröz ince katlı, yaygın kan damarları plexusu ve üretere paralel seyreden lenfatikleri içeren adventisya tabakasıyla sarılmıştır. Bu tabaka sinüste böbrek fibröz kapsülü ile altta mesanenin üstünü kaplayan ince fibröz dokuyla devam eder. Üreterin iç yapısında ortadaki müsküler tabakada; içte longutidinal, dışta sirküler ve oblik kas lifleri bulunur. Sirküler lifler papilla çevresinde yoğunlaşır; ancak gerçek bir sfinkter oluşturmaz. Longitudinal lifler ise intramural üreter kısmında belirginleşir (24,25).

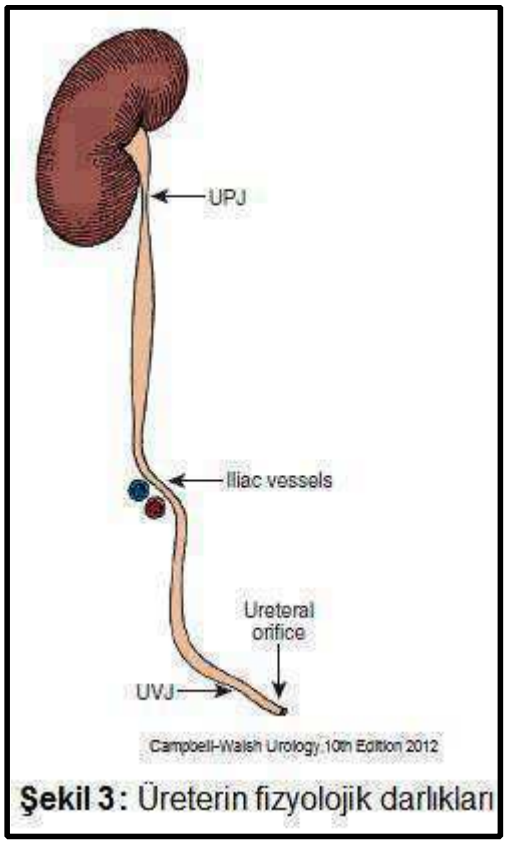
Mukoza transizyonel epitelden oluşur, mesane içinde de devam eder, böbrekte papillalar üzerinde kübik şekil alır. Üreter ve toplayıcı sistem üriner içerik nedeniyle genişlediğinde transizyonel epitelde çizgilenme oluşur. Mukoza da bulunan uzunlamasına katlantılar üreterin gerilmesi ile düzleşir (25)

Üreter üç fizyolojik darlık içerir:

I - Üreteropelvik bileşke: 2 mm genişliğinde üreterin dilate edilebilme özelliği olan en dar yeridir.

II - İliak çapraz seviyesi: İliak arteri üstten çaprazladığı kısımdır ki genişliği 4 mm kadardır.

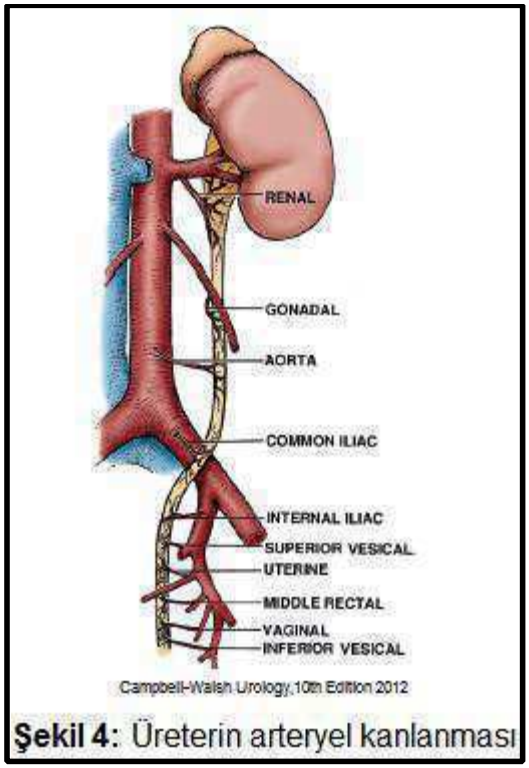
III - İntramural bölge: 3 - 4 mm genişliğindedir. Zor dilate edilebilme özelliği olan üreterin en dar 2. segmentidir (24).



Şekil 3: Üreterin fizyolojik darlıkları

Darlık bölgeleri genellikle üreter taşlarının takılma noktalarıdır. Üreter trasesi boyunca, önce posterio-medial, iliak damar hizasında anterior açılanma gösterir ve minör pelvise girerken posterio-medial konumuna geri döner (24).

Üreteral kanlanma ve lenfatik drenaj üreter kanlanması boyunca olan multipl dallardan beslenerek sağlanır. Retroperitoneumda üreter renal arterden, gonadal arterden abdominal aortadan ve common iliak arterden dallar alabilir. Pelvise açıldıktan sonra internal iliak arterden kaynaklanan küçük arterial dallar distal üretere eklenebilir ya da özellikle vezikal ve uterin arterler, orta rektal veya vaginal arterlerden de dal alabilir. Arterial dallar üst üreterde medial doğrultuda, pelviste lateral doğrultuda bulunurm(24,25). Üreterin venöz drenajı genellikle arterlere paralellik gösterir.



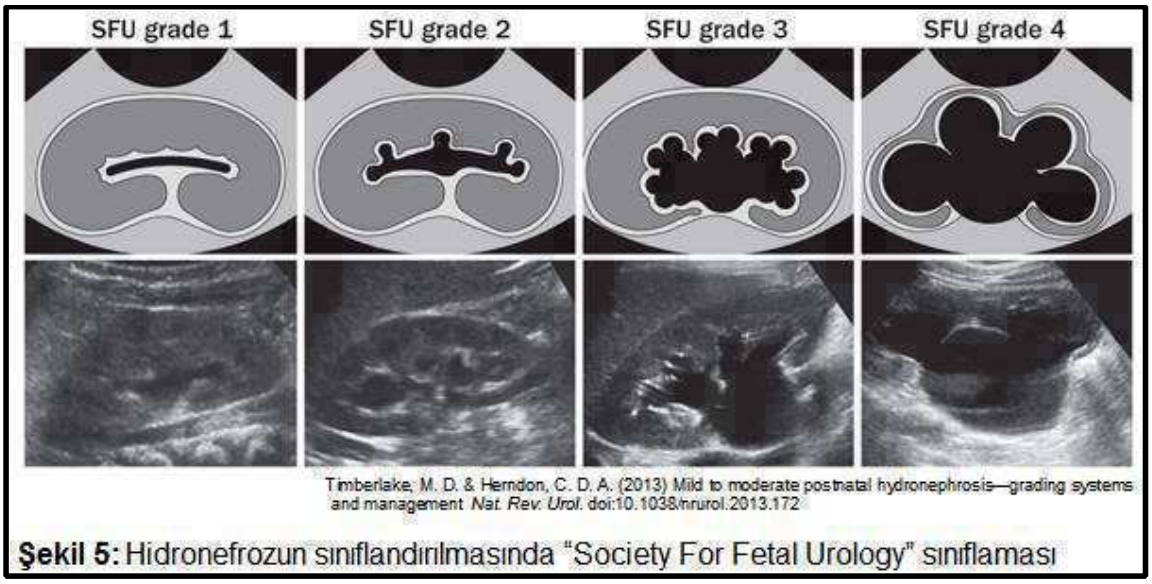
Şekil 4: Üreterin arteryel kanlanması

2.3 OBSTRÜKTİF NEFROPATİ

Üriner sistemin herhangi bir yerinde idrar akımının engellenmesi üriner obstrüksiyonu ve bunu takiben gelişen böbrek pelvis ve kalikslerinin anormal genişlemesi hidronefroz olarak tanımlanır (26,27). Üriner obstrüksiyon sonucunda üriner sistemde oluşan değişiklikler obstrüktif üropati, böbrekte oluşan değişiklikler ise obstrüktif nefropati olarak tanımlanır. Progresif dilatasyon, hidronefroz ve böbrek parankim harabiyeti ile sonuçlanmaktadır (26).

Hidronefroz basit, minimal renal pelvis dilatasyonundan en ağır pelvis ve kaliks dilatasyonlarına kadar çeşitli derecelerde görülebilir (28,29). Basınç yükselmesi böbreklerde önce kaliksleri etkiler. Kalikslerin konkav görüntüsü bozulur, forniksler küntleşir veya yuvarlaklaşır, intrapelvik basınç yüksekliği devam ettikçe papilla yassılaşır, konkav durumdan konveks bir görüntüye girer (26,27). İleri devrelerde ise kaliksler 3-4 cm'lik hidronefrotik poşlar haline gelir. Kaliks içerisindeki basınç artımı ve genişlemeler ile oluşan iskemi papilla atrofisi ve kaliks genişlemeleri ile sonuçlanır. Genellikle kalikslerdeki genişleme ile parankimal atrofi doğru orantılıdır ve intrapelvik basıncın artması sonucu böbrek parankimi renal kapsül ile kaliksler arasına sıkıştığından parankimal atrofi başlar (26,27). Obstrüktif üropati uzun dönemde renal hasar ile renal fonksiyon kaybına ve renal replasman tedavi gereksinimine yol açarak ciddi morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır (30). Obstrüktif üropati doğumsal bir anomali olarak da karşımıza çıkmakla birlikte olguların ancak %25' inde tanı yaşamın ilk yılında, %50'sinde ise 5 yaştan önce konulabilmektedir. Günümüzde prenatal sonografinin gelişmesi ile üst üriner sistemin dilatasyon ve kistik değişikliklere neden olan konjenital üropatilerin tanımlanması mümkün olmuştur. Modern sonografik donanıma rağmen doğum öncesi hidronefroza yol açan spesifik hastalığın tanısı doğuma kadar belirlenemez(31).

Hidronefrozun sınıflandırılmasında “Society For Fetal Urology” sınıflaması günümüzde en yaygın kullanılan yöntem olarak değerini korumaktadır (32). Bu sınıflamaya göre; evre 0 normal, 1. evre renal pelviste hafif genişleme, 2. evre renal pelvis ve kalikslerde belirgin genişleme, 3. evre renal pelvis ve kalikslerde ileri genişleme ve 4. Evre ise böbrek parankim kaybı ile birlikte böbrek pelvisinde ve kalikslerinde ileri genişleme olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 5: Hidronefrozun sınıflandırılmasında “Society For Fetal Urology” sınıflaması

Hidronefrozun derecesi ile düzelme potansiyeli birbiri ile korelasyon gösterir. Evre 1 de düzelme % 50 hastada görülürken bu oran evre 2, 3, 4 de sırayla %36, %16 ve %3’ tür (33). Vakaların çoğu tek taraflıdır ancak %17-30 oranında hidronefroz iki taraflı olabilir. İki taraflı hidronefroz, altta yatan üriner sistem obstrüksiyonunu tespit etmek ve renal fonksiyonları korumak açısından dikkatli bir yaklaşım gerektirir (34). Obstrüktif nefropati konjenital ve diğer nedenleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Doğum sonrası görüntülemede doğum öncesi tespit edilen hidronefrozların % 48 i devamlılık gösterir ve bunların %15’i obstrüksiyonsuz genişlemiş pelvis, %11’i ÜPB darlığı, %9’u vezikoüreteral reflü, %4’ü megaüreter, %2’si multikistik displastik böbrek, %2’si üreterosel, %2’si renal kist, %1’i posterior üretral valve bağlıdır (35).

	RENAL	ÜRETER	MESANE-ÜRETRA
Konjenital	Renal kist Peripelvik kist Polikistik böbrek Üreteropelvik bileşkede fibröz ,obstrüksiyon, aberran damar Non-obstrükte geniş pelvis	Striktür Üreterosel Megaüreter Üreteral valf Ektopik böbrek Retrokaval Üreter Üreterovezikal reflü	Fimozis Üretral striktür Posterior üretral valv
Neoplastik	Wilms tümörü Renal hücreli karsinom Renal pelvisin transizyonel hücreli karsinomu	Üreterin primer karsinomu Metastatik karsinom	Mesane karsinomu Prostat karsinomu Üretra karsinomu Penis karsinomu
İnflamatuvar	Tüberküloz Ekinokok enfeksiyonu	Tüberküloz Şistozomiyazis Apse Endometriyozis	Prostatit, Paraüretral abse
Metabolik ve diğer	Taş Travma Papiller nekroz Renal arter anevrizması	Retroperitoneal fibrozis Aortik anevrizma Radyoterapi Lenfosel Travma Ürinom Gebelik	Benign prostat hipertrofisi Nörojenik mesane

Campbell MF, Wein AJ, Kavoussi LR. Campbell-Walsh urology. 9th / ed. Philadelphia, Pa.: Saunders Elsevier; 2007

Tablo 1: Obstrüktif nefropati nedenleri

2.3.1 UNİLATERAL ÜRETERAL OBSTRÜKSİYON MODELİNDE TÜBÜLER DEĞİŞİKLİKLER

Gillenwater ve arkadaşları (36) 7'si üreteropelvik bileşke obstrüksiyonuna ve 3'ü üreteral obstrüksiyonuna sekonder toplam 10 unilateral üreteral obstrüksiyon (UÜO)'lu hastanın verilerini sunmuştur. Obstrüksüyonlu böbrekteki fonksiyon obstrüksiyonun giderilmesinden bir hafta sonra değerlendirilmişti. Obstrüksüyonlu böbrekteki GFR (24ml/dak), obstrüksüyonlu olmayan böbrekten (60ml/dak) belirgin olarak düşüktü. Obstrüksiyonun giderilmesinden bir hafta sonra obstrüksüyonlu ve obstrüksüyonlu olmayan böbrek arasında gerçek bir konsantrasyon defekti mevcuttu. Parsiyel UÜO larda, özellikle de erken

dönemde, tübüler hasar oluşmadan önce, renal arter stenozundaki bulgulara benzer şekilde, gerçekte sodyum ve su ekskresyonunda azalma ve sonucunda idrar osmolalitesinde artma olmaktadır (37,38). Hanley ve Davidson (39) da böbreğin obstrüksiyondan sonra idrarı konsantre edemediğini tanımlamışlardır. İdrarın konsantre edilememesinin toplayıcı kanalların ya antidiüretik hormon (vazopressin) ya da cAMP stimülasyonuna yanıtsızlığı ile ilişkili olduğu; bu stimülasyonundan herhangi birine toplayıcı kanalların yanıtında %76 azalma görüldüğü bildirilmiştir.

Akuaporinler, membran su kanalları ailesinden olup, transmembran su hareketine moleküler bir taban oluşturmaktadır (40). Akuaporin-2, toplayıcı kanalın predominant vazopressin-sensitif su kanalıdır. Frokiaer ve arkadaşları (41) UÜO da akuaporin ekspresyonundaki değişiklikleri incelemişlerdir. Yirmi dört saatlik UÜO ile akuaporin ekspresyonunda % 77'lik azalma olmuştu ve bu UÜO giderilmesinden sonra en az 24 saat sürmüştü. Obstrüksüyonlu böbrekte serbest su klirensinin artması akuaporin ekspresyonu azalması ile uyumluydu. Obstrüksiyondan sonra böbreğin distal hidrojen iyon sekresyonu bozulur. Bu bikarbonat yüklenmesi sonrası parsiyel karbondioksit basıncının (Pco_2) artamamasının yanı sıra sodyum sülfat verilmesiyle bozulan üriner asidifikasyon ile kendini gösterir. UÜO'nun giderilmesi sonrası fraksiyone fosfat ekskresyonu obstrüksüyonlu böbrekte belirgin bir şekilde (%3,4) azalırken, sağlıklı böbrekte (%35,3) artar. Buna, yine obstrüksüyonlu böbrekte normal böbreğinkine oranla iki kat artan fraksiyone sodyum ekskresyonu eşlik etmektedir. Ancak, fosfat ekskresyonunda ki azalmanın filtre edilen fosfat yükünün azalmasına sekonder olduğuna inanılmaktadır. Su ve tuzdaki ekskresyon artışı distal nefrondaki azalmış reabsorbsiyona sekonderdir. Haris ve Yarger (42) 24 saatlik UÜO'dan sonra ipsilateral böbrekte potasyum ekskresyonunun belirgin azaldığını tanımladılar. Potasyum ekskresyonundaki azalmanın açıklaması; "UÜO'dan sonra distal tübüler volüm akım oranı azalmaktadır, UÜO esnasında distal nefrondan geçen sodyum miktarı da azalmıştır ve direkt mekanik obstrüksiyon nedeniyle normal potasyum sekretuvar mekanizmaları engellenmiştir" şeklinde olabilir. Hipotezini desteklemektedir.

2.3.2 UNİLATERAL ÜRETERAL OBSTRÜKSİYON MODELİNDE FİZYOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Üreterin unilateral oklüzyonu, renal kan akımı (RKA) ve üreteral basınç arasındaki karakteristik trifazik ilişkiyle sonuçlanır, ilk faz, hem üreteral basınçta hem de RKA'da yaklaşık 1 ila 1,5 saat süren bir yükselmeyle karakterizedir. Bunu faz II de, RKA'da bir azalma ve üreteral basınçta oklüzyonun beşinci saatine kadar süren bir yükselme izler. Son faz, üreteral basınçta progresif bir düşme ile birlikte, RKA de daha fazla bir azalma ile devam eder. Hemodinamik olarak, faz I afferent arteriyolde bir vazodilatasyon ile karakterizedir, bunu takiben faz II de efferent arteriyolde vazokonstrüksiyon ve faz III'te afferent arteriyolde vazokonstrüksiyon meydana gelir. UÜO'nun üçüncü fazı vazokonstrüktif fazdır; bu faz hem RKA hem de üreteral basınç azalmasına yol açan preglomerüler ve postglomerüler vazokonstrüksiyon ile karakterizedir. Harris ve Yarger (43) UÜO dan 24 saat sonra süperfisyel kortikal doku perfüzyonunda anlamlı bir azalma ve jukstaglomerüler glomerüllerin perfüzyonunda bir yükselme olduğunu gösterdiler. Yarger ve Griffith (44) UÜO dan 24 saat sonra obstrüksüyonlu böbrekte efektif renal plazma akımının (ERPF), kontrol değerin %55 i dolayında olduğunu gösterdiler, aynı zamanda, üreteral oklüzyon sırasında mikrosfer enjeksiyonu kullanarak, intrarenal kan akımının jukstamedullar nefronlarda arttığını, buna karşın dış kortikal nefronlarda kan akımının azaldığını ortaya koydular. İntrarenal kan akımındaki bu değişimin, iç medullaya oranla dış kortekste renin seviyesinin nispeten daha fazla artmasıyla açıklanabileceğine inandılar. Glomerüler yapı çalışmaları, unilateral üreteral obstrüksiyona eşlik eden zayıf glomerüler perfüzyonu göstermektedir. Obstrüksiyon sırasında GFR'nin direkt ölçülmesini sağlayan etilendiamintetraasetikasit Cr51'in devamlı infüzyonu ile yapılan çalışmalar UÜO'nun başlangıcından sonra GFR de %75'lik bir azalma olduğunu göstermiştir (45). UÜO'nun faz I ve III'ündeki fizyolojik değişikliklerin karakteristikleri belli zamandır bilinmesine karşın, altta yatan sellüler ve moleküler değişiklikleri anlayabilmek için yapılan çalışmalara hala devam edilmektedir. Daha önceki çalışmalar afferent ve efferent arteriol tonuslarındaki

değişiklikleri açıklamak için lokal fiziksel etkileşimlere odaklanmıştı. Bununla birlikte, artık bu değişikliklerin önemli bir kısmından biyokimyasal mediatörlerin sorumlu olduğu aşikâr hale geldi. RKA'daki akut ve kronik değişikliklerde anjiotensin II (AII), nitrik oksit (NO) ve endotelin ve eikosanoidlerin (prostaglandinler ve tromboksan) rolünü belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır.

2.3.3 HAYVAN MODELLERİNDE OBSTRÜKTİF NEFROPATİ

Konjenital obstrüktif nefropati patofizyolojisini araştırmak için fetal koyun ve primatları içeren çeşitli hayvan modelleri kullanılmıştır (46,47). Fetal koyunlardaki tek taraflı üreteral tıkanıklık hidronefroza, renal kistik ya da displastik değişikliklere ve böbrek büyümesinde farklılıklara yol açabilir (48). Fetal Rhesus maymununda deneysel tek taraflı üreteral tıkanıklık kortikal üreterik kanalın dallanmasını engeller ve glomerüler bazal membran yapısını değiştirir (49).

İnsanda nefrogenez 34. gestasyon haftasında tamamlanır ve nefron matürasyonu hayatın ilk 6 ayı boyunca devam eder (50). İlginç olarak yenidoğan farelerde veya sıçanlarda nefrogenez doğum sonrası da devam eder (51-53). Nefrogenez süresine bağlı olarak sıçan veya fare doğumda, insandaki midtrimestere; 7 günlük iken ise insanda tam miadında doğumdaki nefrogenez sürecine karşılık gelir. (54). Nefron matürasyonu sıçanlarda doğumdan sonra ikinci haftaya kadar devam eder (55). Tek taraflı üreteral obstrüksiyon gelişmesi glomerüler ve tubuler matürasyonu engeller (56,57). Tubuler apopitoz obstrüktif nefropatili insan fetus ve infantlarda tanımlanmıştır (58). Fetal Rheseus maymunlarında ÜPB obstrüksiyonu, hem kist formasyonunu hem de podosit ve toplayıcı kanal hücrelerinde apopitozu uyarır (59). Renal tubuler apopitoz yenidoğan farede tek taraflı üreteral tıkanıklığın sonucudur ve tubuler atrofi ile ilişkilidir (60). Tek taraflı üreteral obstrüksiyonu takiben yenidoğan farelerde hem nekroze olan proksimal tubuler hücreler hem de genişlemiş toplayıcı kanallardaki epitelyal hücreler apopitoza uğrar (61). Tubuler atrofi ve interstisyel

fibrozis parsiyel üreteral obstrüksiyonu izleyen 14 günde, tam obstrüksiyon durumuna göre daha az ciddidir (62). Özellikle obstrükte büyüyen böbreğin ciddi üreteral stenozunda (üreter çapında yaklaşık % 70 azalma) böbrek ciddi oranda hasarlanır, buna karşın üreterin % 60'dan az daraldığı durumlarda böbrek gelişimi korunur (62). Ek olarak sağlam olan karşı böbrekte tıkanıklık süresi ile doğru orantılı olarak kompansatuvar büyüme olur (63).

Üreteropelvik bileşke darlıklı çocuk veya infantlarda nefron sayısı azalır. Karşı böbrekte multikistik böbrek, renal agenezi veya renal hipoplazi insidansı anlamlı olarak artığı gösterilmiştir (64,65). Obstrükte böbrekte uzun süreli izlemde böbrek yetmezliğine ilerleme riski artmıştır. Yenidoğan sıçanlarda hem parsiyel hem de tam tek taraflı üreteral obstrüksiyonda, obstrüksiyon ciddiyeti ile orantılı olarak nefron sayısının azaldığı gösterilmiştir (66,67).

2.4 OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres; herhangi bir nedenle oksidan üretiminde artış ve antioksidan savunma mekanizmasında yetersizlik nedeniyle aradaki dengenin bozulması sonucunda oluşan doku hasarı olarak tanımlamaktadır (68).

Oksidatif stres insandaki birçok patolojik durumun meydana gelmesinde, ilerlemesinde ve komplikasyonlarının ortaya çıkmasında önemli yere sahiptir. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar çoğunlukla oksijenin indirgenmesiyle oluşan serbest radikallerin organizmadaki biyolojik ve kimyasal özelliklerine aittir. Oksijen, serbest radikallerin ana kaynaklarından birisi olup genel görüş, serbest radikallerin oksidan özelliğinin yapısındaki oksijenden kaynaklandığı yönündedir.

Gerçekte oksijen radikallerinin üretimi normal biyolojik fonksiyonların ayrılmaz bir parçasıdır. Serbest radikaller her zaman oksidan aktivite göstermez ve sadece oksidatif stresten sorumlu değildirler. Serbest radikaller ve oksidasyon organizmada birçok biyokimyasal reaksiyon ve hücre iletim sisteminde rol almaktadırlar. Bazal koşullarda tüm aerobik hücrelerde; solunum,

fagositoz, araşidonik asit metabolizması gibi reaksiyonlarda bir miktar serbest oksijen radikali oluşur ve bunlar sağlıklı bir organizmada antioksidan savunma mekanizmalar tarafından hızla ortadan kaldırılır (69,70).

Sonuç olarak oksidatif stres; hücresel antioksidan savunmanın reaktif oksijen türlerinin seviyesini toksik eşiğin altında tutmakta yetersiz kalması olarak tanımlanabilir (71). Başka bir şekilde tanımlayacak olursak; doku veya hücrede oluşan serbest oksijen radikallerinin konsantrasyonunun antioksidan kapasiteyi aşması olarak tanımlanır. Oksidatif stres, aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, antioksidan savunmanın yetersizliği ya da her iki durumun birlikte bulunması ile oluşur (71).

Oksidatif stres, tüm hücrelerde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler oluşturarak hasara neden olabilir. Oksidatif stresin hücredeki başlıca bilinen hedefleri çoklu doymamış yağlar, şekerler, proteinler ve nükleik asittir. Oksidatif stres, iyon dengesi hücre redoks sistemini, hücre içi haberleşmeyi ve gen transkripsiyonunu etkiler, sonuç olarak, hücre döngüsünü etkileyerek hücrenin ölümüne neden olur (72).

2.4.1 Serbest Radikaller ve Oksidanlar

Serbest radikaller; paylaşılmamış bir veya birden fazla elektrona sahip molekül veya atomlar olup, paylaşılmamış elektronun üzerinde olduğu oksijen molekülleridirler (73). Ortamda bulunan kimyasal veya fiziksel enerji kaynaklarının, kovalent bağlarında hemolize sebep olarak iki farklı türde paylaşılmamış olan elektron oluşturması serbest radikal oluşumuna neden olur. Bir diğer radikal oluşturma yöntemi de redoks reaksiyonudur. Bu reaksiyonlarda bir elektronun kaybı veya kazanılması söz konusudur.

$$A \longrightarrow e^- + A + \text{(Oksidasyon)}$$

$$B + e^- \longrightarrow B^- \text{ (Redüksiyon- İndüksiyon)}$$

Her oksidasyon bir redüksiyonla birliktedir. Böylece kütle kuralına göre oksidatif streste her iki reaksiyon da yer alır. Serbest radikallerin aktiviteleri farklılık gösterir. Hidroksil (HO^-) gibi bazı radikaller yüksek aktiviteye sahipken, E vitamininin oksidasyon ürünü olan tokoferoksil gibi bazı bileşiklerin aktiviteleri çok önemli değildir. Serbest radikallerin hedef molekülle kompleks oluşturma reaksiyonları; başlangıç, ilerleme ve sonlanma olmak üzere üç aşamada meydana gelir. Serbest radikalin etkinliği substrata ve bulunduğu fiziksel şartlara göre farklılık gösterir. Aynı serbest radikal, aynı maddeyi oksidant veya redüktant olarak kullanabilir. Reaksiyonun oluşma hızı; ortamın ısısına, pH'sına ve ortamdaki katalizörlere bağlıdır (74).

Serbet radikaller organizmada normal olarak meydana gelebildiği gibi(mitokondride gerçekleşen elektron-transport reaksiyonları, P450 metabolizması, peroksizomlarda gerçekleşen reaksiyonlar, inflamatuvar hücre aktivasyonları vb.), çeşitli dış kaynaklı etkilerle de(UV ışınları, X-ray, sigara, çevresel toksinler, farmakolojik tedaviler) oluşabilir. Oksijen türevi radikaller, biyolojik sistemin en iyi bilinen serbest radikalleridir ve canlı hücrelerde, normal süreçte fizyolojik miktarlarda üretilirler. Aşırı oluştuklarında hücre ve dokuların hasarına neden olurlar (77).

2.4.2 Serbest Radikal Reaksiyonlar

Oksijen radikalleri içinde, süperoksit anyonu (O_2^-), oksijenin bir elektron almasıyla oluşan ilk ürün olup, en kolay ve en fazla oluşan serbest radikaldir. Canlılarda diğer radikallerin oluşumu sıklıkla O_2^- nin birikimine bağlıdır. O_2^- radikalinin ana kaynağı ise moleküler oksijenin metabolize edildiği, mitokondriyal elektron transport zinciridir. Elektron transport zincirinde moleküler oksijenin biyolojik oksidasyonu, organizmaya enerji kazandıran ve yaşamın devamını sağlayan bir süreç olup, bu zincirin ara basamaklarında O_2^- oluşur ve normal artlarda oluşan O_2^-'ler organizmadan dismutasyon denilen bir dizi reaksiyon vasıtasıyla uzaklaştırılır (73).

Bu reaksiyonlar hidrojen peroksit (H_2O_2) ve perhidroksi (OH_2^-) radikallerinin meydana gelmesi ile sonuçlanır. Bu dismutasyon reaksiyonları kendiliğinden meydana gelebileceği gibi süperoksid dismutaz (SOD) tarafından da katalizlenebilir.

Oluşan H_2O_2, SOD gibi antioksidan enzim sistemlerinden olan katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) ile suya dönüştürülür.
Oksijen radikalleri içinde en fazla reaktif olan hidroksil (OH^-) radikalidir ve hemen her molekül ile reaksiyona girebilme özelliğine sahip olup invivo oluşumu için Haber Weis reaksiyonuna gereksinim vardır. Bu tepkimede O_2^- ve H_2O_2 etkileşir ve sonuçta OH^- radikali meydana gelir.

$$O_2 + H_2O_2 \longrightarrow OH^- + OH^- + O_2$$

İskemi oluştuğunda ve de özellikle reperfüzyon ile dokuların oksijenasyonu ile oluşan bu reaksiyonu demir gibi metaloproteinler, askorbik asit ve NADPH katalize edebilir.

$$Fe^{+3} + 0_2^- \longrightarrow Fe^{+2} + O_2$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + OH^- + OH^-$$

Organizmada OH^- radikaline karşı SOD, KAT, GPx gibi bir antioksidan savunma mekanizmalar yoktur (75).

2.4.3 Serbest Oksijen Radikalleri

Oksijen 8 atom numaralı kararsız bir element olup doğada dioksijen (O_2) halinde bulunur. Bu durum, enerji düzeylerindeki elektronlarının yapısıyla ilişkilidir (76). Oksijen molekülündeki aynı yöne dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali önemlidir ve bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde ‘singlet oksijen’ oluşur. Orbitallerden birine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha eklenirse oksijen radikali meydana gelir (Tablo 2).

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil (HO^-)	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
Alkoksil (RO^-)	Singlet Oksijen (O_2)
Peroksil (ROO^-)	Ozon (O_3)
Superoksit (O_2^-)	Hipoklorid (HOCl)
Nitrik oksit (NO^-)	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Azot dioksit (NO_2^-)	Peroksinitrit ($ONOO^-$)

Tablo 2: Oksijen türevi bileşikleri

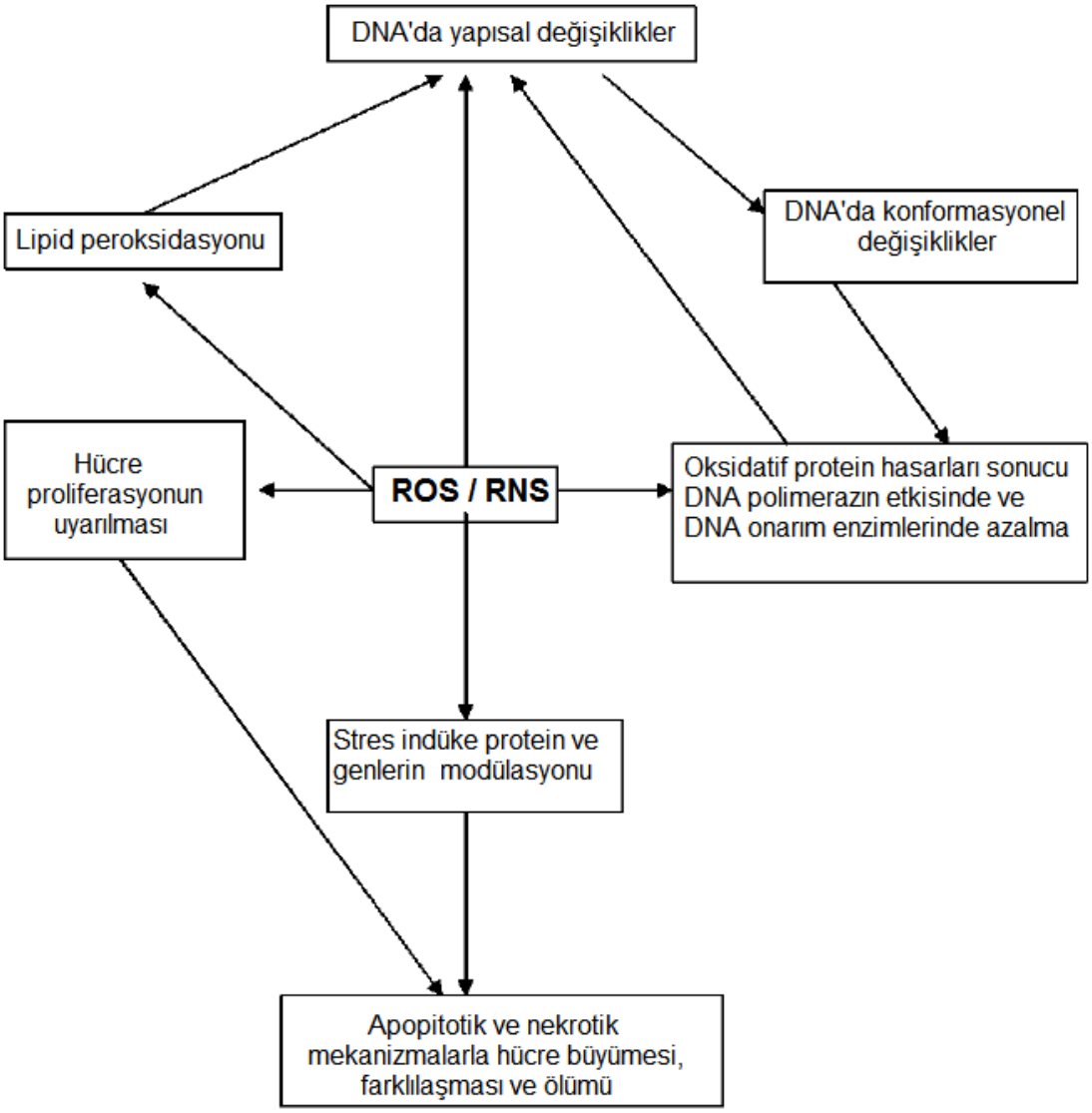
Oluşan radikal eşleşlememiş tek elektronu nedeniyle dengesiz olup hızla ortamdan kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Sonuçta radikal olmayan yapıyı radikal şekle dönüştürebilirler (76).

Serbest radikallerin biyolojik ortamlardaki türleri Reaktif Oksijen Türleri(Reactive Oxygene Species - ROS) ve Reaktif Nitrojen Türleri(Reactive Nitrogene Species - RNS)'dir. Bunlardan ROS; oksijen radikallerini ve radikal olmayan reaktif oksijen türevlerini kapsayan genel bir terimdir. RNS'ler de, fizyolojik önemi olan serbest radikal türleridir (80). Yüksek konsantrasyonlarda serbest radikaller ve radikal türevi, radikal olmayan reaktif türler; canlı organizmalar için tehlikelidir ve tüm hücre yapılarına hasar verir. Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda nitrik oksit, süperoksit anyonu ve reaktif oksijen türleri sinyal iletiminde düzenleyici medyatör olarak önemli rol oynarlar. ROS'ların aracılık yaptığı birçok cevap, aslında hücreleri oksidatif strese karşı korur, redoks homeostazını yeniden oluştururlar (81).

Reaktif Oksijen Türleri(ROS)	Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)
Hidroksil radikali(OH^-)	Nitrojen dioksit(NO_2^-)
Süperoksit Anyonu(O_2^-)	Nitrik Oksit(NO)
Hipoklorik Asit(HOCl)	Peroksinitrit($ONOO^-$)
Singlet O_2	
Hidrojen Peroksinitrit(H_2O_2)	
Peroksil Radikali($ROO^{-)}$	

Tablo 3: Reaktif Oksijen Türleri(Reactive Oxygene Species - ROS) ve Reaktif Nitrojen Türleri(Reactive Nitrogene Species - RNS)

Reaktif nitrojen metabolitleri serbest nitrojen metabolitleridir ve serbest oksijen radikal (SOR)'un alt sınıfı oldukları düşünülür.



Şekil 6: Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS veRNS) vücuttaki etkileri

2.4.4 Süperoksit Radikalleri (O_2^-)

Süperoksit radikalleri (O_2^-), hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu ile oluşmaktadırlar. O_2^- oluşumu; elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır.

Zayıf bir oksidan olan O_2^- kendi başına önemli hücre hasarına yol açması olağan değildir, ancak oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonu tetikleyebilir (78). Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonu olup, O_2^- ve H_2O_2 demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan HO^- radikalini oluştururlar.

$$O_2^- + e^- \longrightarrow O_2^- \text{ (süperoksid radikali)}$$

$$H_2O_2 + O_2^- \longrightarrow OH^- + OH^- + O_2^-$$

Üretilen bu OH^- oldukça reaktif olup DNA gibi önemli yapılarla reaksiyona girerek önemli hasarlar oluşturabilmektedirler (79).

O_2^-, hücre içi demir depolarından demiri serbestleştirir ve serbest haldeki demir iyonu Haber-Weiss gibi reaksiyonlarda veya diğer serbest radikal aracılıklı hücre hasarında rol alabilir. Superoksit radikalleri çok kısa bir yarı ömre sahip olup dismutasyon ile H_2O_2 ve oksijen oluştururlar. Dismutasyon reaksiyonu spontan olarak meydana gelir ve SOD enzimi ile katalizlenir.

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\textbf{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

2.4.5 Süperoksit dismutaz

Süperoksit serbest radikalinin ($O2^{\cdot}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. İnsan seminal plazması yüksek SOD aktivitesine sahiptir ve çoğu prostattan sentezlenir.

Dört çesit SOD tanımlanmıştır.

1. Mangan içeren dismutaz (Mn^- SOD): Homotetramer yapıdadır. Mitokondrideki solunum zinciri ve oksijen radikalinin major kaynagıdır. Mn^- SOD süperoksit radikalini uzaklastıran primer antioksidan enzimdir. Fe^- SOD ile homologtur.

2. Bakır ve çinko içeren dismutaz (Cu/Zn^- SOD): 32 kDa agırlıgında dimerik yapıdadır. Sitoplazmada bulunur. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomeri sitozolik Cu/Zn^- SOD'dur ve aktivitesinin %75'inden sorumludur (82).

3. Ekstrasellüler dismutaz (EC-SOD): intertisyel alanda ve plazma, lenf ve sinovial sıvılarda bulunan tetramerik yapıda bakır ve çinko içeren bir enzimdir.

4. Nikel içeren dismutaz (Ni-SOD): Streptomyces sp ve Streptomyces coelicolor' un sitozolik fraksiyonundan saflastırılmıstır. Aminoasit kompozisyonu diger SOD' lardan farklıdır. Siyanid ile inhibe olmaktadır (83).

SOD'un ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksid üretimi olmasına rağmen, bu enzim sayesinde intrasellüler süperoksid düzeyleri düşük tutulur. SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı başlıca enzimatik savunma mekanizmalarıdır.

2.4.6 Oksidatif Stres ve Antioksidan Enzimlerin Böbrek Üzerine Etkileri

Böbrekler aerobik metabolizmanın belirgin bir şekilde görüldüğü, canlılar için önemli bir organdır. Vücut sıvı elektrolit dengesini muhafaza etmek için, böbrekler total vücut ağırlığının %1' ini oluşturmasına rağmen, bütün vücut oksijen tüketiminin %10' undan sorumludur (75,76). Kardiak outputun %20' sine de maruz kalan süzme organı böbrekler, bu özelliklerinden dolayı dolaşımdaki polimorfonükleer lökositlerin (PMN) ve monositlerin glomerüllere ve interstisyel dokuya infiltrasyonu sonucunda ek bir oksidan strese maruz kalırlar (84-87).

Böbrekler, yüksek O2 tüketimi ve metabolik aktiviteye ek olarak, infiltratif hücreler ve kendi yerleşik hücrelerinden de reaktif O2 türleri oluşması nedeniyle zaman zaman, kendi total antioksidan korunma mekanizmasını aşan oksidan

stresle karşılaşmakta ve böbreklerde reaktif O2 türlerine baglı doku hasarları oluşmaktadır (81,84,85,86,88).

Reaktif oksijen türlerinin iskemik, toksik, immunolojik kaynaklı böbrek harabiyetinde rol oynadığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (76,81). Deneysel böbrek iskemisinde, elektron transport zinciri, ksantin oksidaz gibi oksidan enzimler, fagositler, epinefrinin oto oksidasyonu ve araşidonik asit metabolitleri, reaktif oksijen türlerinin (ROT) kaynaklarını oluşturmaktadır (84-90).

ROT, hücre ve organel membranlarında lipit peroksidasyona neden olarak ve özellikle proksimal tübül segmentlerinde, tübül yapısını, hücre transport kapasitesini ve enerji üretimini bozarak etkilerini gösterirler (91-94).

Deneysel immün glomerülonefritte ROT, PMN ve monositler gibi kan kaynaklı infiltratif hücrelerden oluşurlar ve glomerül hücrelerine ve özellikle mezenşial hücrelere yerleşirler. Bunların oluşması, morfolojik lezyonların meydana gelmesine, proteazların aktive olmasına, proteoglikan sentezinin düşmesine ve bunlara bağlı olarak proteinlere karsı glomerüler permabilite artışının görülmesine neden olur (86,94,95).

ROT' ları prostoglandin, tromboksan, trombosit aktivite edici faktör gibi vazokonstriktör bioaktif lipitleri serbestleştirerek ve vazodilatör olan nitrik oksiti inaktive ederek glomerül kan akımının ve glomerül filtrasyon hızının düşmesini indüklerler (86,96).

Proksimal, distal ve toplayıcı segmentlerdeki böbrek tübüler hücrelerinin ROT' ları üretebildikleri bildirilmiştir (85,86,88,91,92).

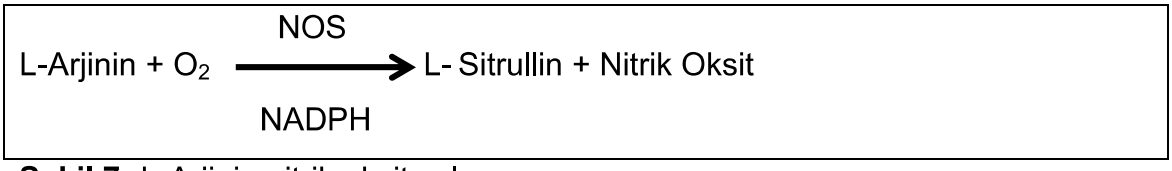
Glomerüler hastalıklar	Minimal lezyon hastalığı Membranöz nefropati Nötrofil infiltrasyonu sonucu gelişen hasarlar
Akut böbrek yetmezliği	Post - iskemik Toksik (Cis- platinum, gentamisin, kontrast ilaçlar, myoglobinüri, hemoglobinüri, radyasyon, hemolitik-üremik sendrom)
Obstrüktif nefropati	
Pyelonefrit	

Tablo 4: Reaktif oksijen partiküllerinin patogenezinde rol oynadığı düşünülen böbrek hastalıkları

Böbrekler oksidatif hasara uğradıktan sonra ortamdaki antioksidan enzimler lokal antioksidan savunma genlerinin aktivasyonu ile regüle edilirler (98). Sonuç olarak böbrekler, oksidatif stres karşısında antioksidan savunma mekanizmasını kullanırlar ve bu savunma doğal veya farmakolojik ajanlarla güçlendirilebilir. Birçok hasara karşı yeni tedavi yaklaşımları halen yoğun bir şekilde araştırılmaktadır.

2.5 NİTRİK OKSİT (NO)

Nitrik oksit çok yönlü bir biyolojik haberci ve farklı biyolojik etkilere sahip kimyasal bir moleküldür. Başlangıçta güçlü bir vazodilatatör ve nörotransmitter ajan olarak tanımlanan NO'nun, yapılan çalışmalarla intraselüler ve ektraselüler olaylarda vücudun birçok organında farklı fonksiyonlarının olduğu ortaya çıkarılmıştır (101). NO, Şekil 7'de gösterilen kimyasal olarak canlılarda sitokrom P–450 redüktaz homoloğu olan nitrik oksit sentaz denilen enzim grubu tarafından organizmanın birçok hücresinde bulunan ve bir aminoasit olan L-arjininden sitrüllin oluşumu esnasında L-arjinin'in guanidin nitrojen grubunun hidroksilasyonu sonucu oluşan bir ara üründür (102,103).



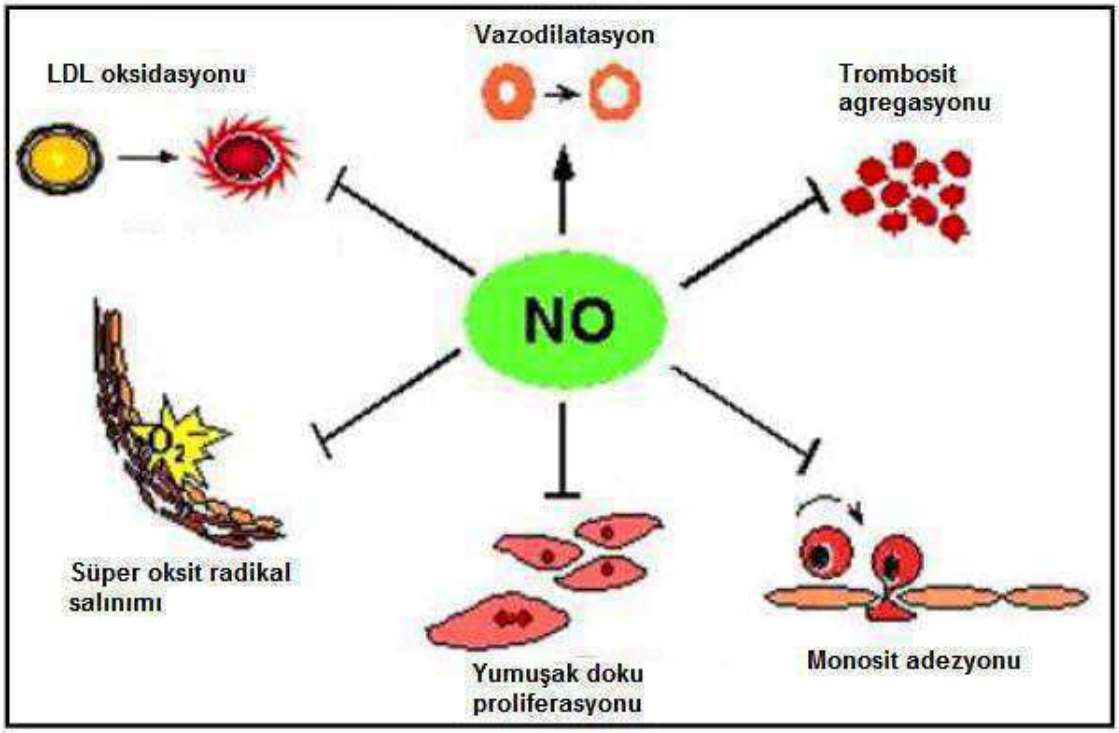
Şekil 7: L-Arjinin nitrik oksit yolu

2.5.1 Nitrik Oksit'in Fizyolojik ve Patolojik Etkileri

Nitrik oksit'in etkisinin fizyolojik veya patolojik olmasının, sentezlenen ya da ortamda bulunan NO miktarı ve/veya sentez süresine bağlı olduğu bildirilmiştir (103). NO'nun vazodilatasyon, nörotransmisyon, antitrombotik, antiinflamatuar, antioksidan, immunomodülasyon, damar geçirgenliğinin kontrolü gibi görevleri vardır. Yine NO'nun penil ereksiyon, barsak ve böbreklerde tuz ve su emilimi, iştah ve besin alımı, yara iyileşmesi, hafıza oluşumu, sinirsel aktivite, ağrının hafifletilmesi, hafıza ve öğrenme fonksiyonları, koku alma, görme, mide ve sindirim sistemi sfinkterlerinin gevşemesi gibi birçok olayda fizyolojik etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (103-105). NO serbest bir radikal olduğu için hücre membranlarını serbestçe geçebilmekte ve hücreler arası iletişimi sağlamaktadır. Diğer hücrelerarası haberci moleküllerden farklı olarak reseptörlere bağlanmaz, yarılanma ömrü kısa, etkileri geçici ve lokaldir (104). NO hücre içinde guanilat siklaz enzimini aktive ederek, kas kasılmasını sağlayan siklik guanozin monofosfat miktarını artırır. Böylece damar genişlemesi, sinapslardan uyarı geçişi, trombositlerin yapışmasının engellenmesi, iyon kanallarının açılması ve kapanması gibi olaylar gerçekleşir (101). Normal fizyolojik olayların düzenlenmesinde görev alan NO'nun çeşitli yangısal olaylar ve hastalıklarda sentezi artmakta ve sonuçta doku hasarına neden olmaktadır. NO bu patolojik etkilerini, reaktif türlerin enzim inhibisyonlarına, deoksiribonukleikasit parçalanmalarına, zar lipidlerinin oksidatif yıkılmalarına ve hücresel antioksidanların tüketimine neden olarak oluşturur (105). NO'nun birçok doku ve organda mevcut olan düzenleyici etkileri: Platelet agregasyonunun inhibisyonu, renal ve intestinal görevleri, düz kasların gevşemesi, hücre adhezyonunun kontrolü, damar geçirgenliğindeki etkileri, immun sistemdeki fonksiyonlarıdır. Koruyucu etkileri: Antioksidan fonksiyonu, anti inflamatuvar etkileri, TNF toksisitesine karşı etkileridir. Zararlı etkileri ise antioksidanları tüketmesi, enzim inhibisyonu, deoksiribonukleikasit hasarları, lipid peroksidasyonu ve diğer toksik etkenlere duyarlılığı artırmasıdır (106).

NO'nun fizyolojik özelliklerini kısaca sıralarsak:

- Guanilat siklaz,siklooksigenaz aktivasyonu
- Normal vasküler tonus
- Platellet agregasyonunun inhibisyonu
- Kısa süreli vazodilatasyon
- Gıda alımı ile uyarılan mide dilatasyonu
- Mukoza sterilitesi
- Uzun süreli potansiasyon-hafıza
- Sinir iletimi
- Analjezi
- Gebelikte maternal immunsupresyon



Böger, R.H. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor.Cardiovasc. Res 2003; 34: 14781-14787

Şekil 8: Nitrik oksitin etkileri

2.5.2 Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri ve Özellikleri

Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri yapısal ve sentezi uyarılabilen olarak iki ana gruba ayrılır (104);

1- Konstitütif nitrik oksit sentaz (cNOS): Endotel ve nöron kaynaklıdır. Bu izoenzim özellikle damar endotel hücreleri, idrar yolu hücreleri, santral ve periferal sinir sistemi hücreleri, endokard, miyokard, trombosit, mast hücreleri ve nötrofillerde bulunmaktadır. Aktif hale gelebilmesi için kalsiyuma ihtiyaç duyar. Enzimin kalsiyum-kalmodulin ile aktive olması nedeniyle kalsiyuma bağımlı NOS veya konstitütif NOS olarak adlandırılır (105).

a- Nöronal (nNOS) : Nöronlardaki nitrik oksit sentaz

b- Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS): Kalsiyum bağımlı izoenzimdir. Nitrik oksit sentezi damarlarda başlıca "shear stres" ile tetiklenir. Bu fenomen, kalbin her sistolde kanı damarlara göndermesi sonucu damar endoteli yüzeyinde oluşturduğu mekanik etki olarak ifade edilebilir. Endotel hücreleri bu mekanik etki ile şekil değişikliğine zorlanırken hücre iskeleti aracılığı ile hücre içine sinyaller gönderir. Bunun sonucunda Protein Kinaz G aktive edilerek eNOS'u fosforile eder. Fosforilasyon, bu enzimin aktivasyonuna neden olur. Sonuçta, endotel hücresinden sürekli NO üretilir. İlginç olarak bu şekilde NO üretimi için Ca2+'a gerek yoktur, eNOS'un fosforile edilerek aktive edilmesi yeterlidir. Diğer taraftan hücre içi Ca2+ düzeylerini arttıran bileşikler de vasküler endotelyumda fosfolipaz C enzimi üzerinden Ca2+'a bağımlı bir enzim olan eNOS enzimini aktive ederler (106).

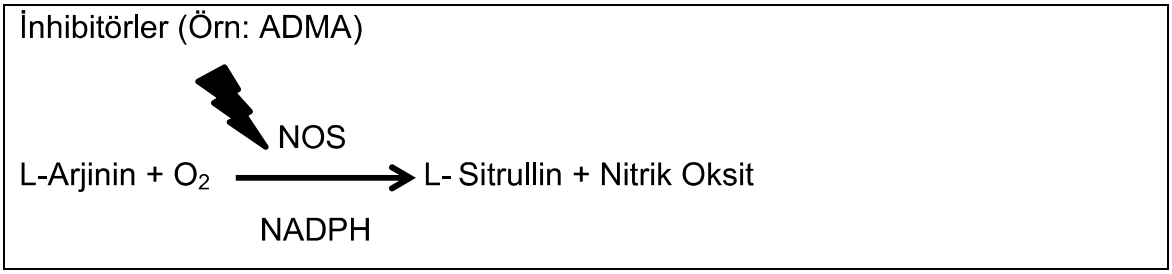
2- İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS): iNOS enzimi özellikle makrofaj, nötrofil, hepatosit, monosit, damar endotel ile düz kas hücreleri, kalp kası hücreleri, nöronlar ve mikroglial hücrelerden sentezlenmektedir. Diğerlerinin aksine hücre içinde bulunmayan iNOS, endotoksin ve çeşitli sitokinlerden interlökin-1, tümör nekrozis faktör alfa, interferon alfa tarafından indüklenen ve indüklendiğinde daha uzun sürede ve büyük miktarlarda NO üreten,

kalsiyumdan bağımsız bir enzimdir. Enzim bu özelliklerden dolayı indüklenebilir veya kalsiyumdan bağımsız nitrik oksit sentaz olarak adlandırılır. iNOS kofaktör olarak kalmodulin yerine tetrahidrobiopterine gereksinim duyar (105). Southan ve ark. (107) nitrik oksit sentaz inhibitörlerini temsil eden yeni bir sınıfı tarihe rapor etmiştir. Tiyoüre türevleri son derece güçlü NO sentaz inhibitörleri olarak tespit edilmiştir. Bu sınıfın etil-tiyoüre, izopropil-tiyoüre eNOS için güçlü inhibitör, iNOS izoforma hafif seçici inhibitör iken S-metil-izotiyoüre (SMT) ve aminoetil-tiyoüre iNOS aktivitesinin oldukça seçici inhibitörleridir. Bu bileşiklerin SMT gibi bazıları ile iNOS selektif inhibisyonu da in vitro olarak gösterilmiştir. Bu son ajanlar çeşitli hastalık modellerinde iNOS rolünü incelemek için faydalı bir araç olabilir. Septik şok, dolaşımsal şok ya da kanser gibi iNOS indüksiyonu ile ilişkili hastalıkların tedavisinde yararlı olabilir (107).

2.5.3 Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörleri

Nitrik oksit sentaz inhibitörleri biyolojik sistemlerde NO'in rollerini araştırmada çok faydalı olmuş maddelerdir. NO sentezinde L-arjinin özgül bir şekilde NO'e dönüşmektedir. Buna karşılık çeşitli L-arjinin analogları ise L-arjinin yerine geçerek NO sentezini kompetetif bir yolla önleyebilmektedir (108-110).

N-monometil-arjinin (L-NMMA) NOS inhibitörlerinin prototipidir. Her üç NOS izoformu için L-NMMA inhibitör konsantrasyonu 2–5 mol/L arasındadır. Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) L-NMMA ile yaklaşık olarak aynı etkinliğe sahiptir (111-115). Arjinin ve ADMA, nitrik oksit sentezinin kontrolünde önemli rol oynarlar. Simetrik dimetilarijinin (SDMA) 'nin NOS enzimi üzerine inaktive edici etkisi yoktur, fakat arjinin ve ADMA ile hücre giriş yolunu etkileyerek NO üretim hızını dolaylı yoldan azaltır. Yüksek konsantrasyondaki ADMA, NOS inhibisyonu yanı sıra L- Arjininin hücre içine transportunu engelleyerek de NO sentezini azaltır (116).



Şekil 9: NO sentezinde ADMA'nın yeri

Glukokortikoidler in vitro olarak iNOS'ın indüklenmesini önlerler. Ancak indüklenmiş iNOS aktivitesi üzerine etkileri yoktur (117). Bu etki spesifiktir ve glukokortikoidlerin bazı fizyolojik ve farmakolojik etkilerini açıklayabilir. NO'in indüklenmesinin yol açtığı vasküler relaksasyon, vazokonstrüksiyon ajanlara yanıtsızlık ve cGMP'de ki yükselme deksametazon ile önlenebilmektedir (110,117).

2.5.4 Nitrik Oksit Ölçümü

Nitrik oksit ölçümünde değişik yöntemler kullanılmaktadır. Kemilüminesans, hemoglobin trapping yöntemi, nitrit ve nitrat tayini NO düzeylerini saptamada kullanılmaktadır. Ayrıca NOS aktivitesinin ölçümü ile de dolaylı olarak NO düzeyleri ölçülebilmektedir. Birçok araştırmada NO'in metabolitleri olan nitrit ve nitrat miktarlarının ölçümü NO düzeyinin direkt ve objektif olarak tayininde kullanılmaktadır. Nitrit ve nitrat, NO'in in vivo olarak son ürünleridir. Nitrit ve nitrat oranı değişkendir ve kesin olarak öngörülemez. Böylece total NO üretiminin en iyi göstergesi nitrit ve nitrat üretiminin toplamıdır (118).

2.5.5 Nitrik Oksit ve Böbrekler

Nitrik oksit'in böbrek dokusunda önemli görevlere sahip olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar neticesinde arjinin aminoasidinden sentezlenen NO'nun böbrek fizyolojisi ve patolojisinde önemli rolleri olduğu ortaya çıkarılmıştır (106,119,120). NO'nun böbrek otoregülasyonu, tubuloglomerüler feedback, renin salınması, basınca bağlı sodyum geri çıkarılması, afferent ve efferent arterlerin tonusunun düzenlenmesi, tubul işlevlerinin düzenlenmesi, tubullerde elektrolit ve su transportu, böbrekte kan

basıncının düzenlenmesi, proksimal tubullerde sodyum, bikarbonat ve suyun geri emiliminin uyarılması ve idrar hacmi üzerine etki yaptığı bildirilmiştir (121). NO böbrek dokusunda vazodilatasyona yol açarak renal kan akımını ve glomerüler filtrasyon hızını artırır, nefron boyunca sodyum transportunu azaltır, jukstaglomerüler apparatus ve tubuloglomerüler feedback yoluyla renin salınmasını düzenler. NO'nun afferent arterioller üzerindeki güçlü vazodilatatör etkisini anjiotensin II'nin vazokonstruktif etkilerini antagonize ederek oluşturduğu belirtilmektedir (103,121). Normal böbrekte hem eNOS ve hem de nNOS mevcuttur. iNos izoformu normal rat ve fare böbreklerinin ikisinde birden bulunur(123,124). Bunlardan eNOS renal damarlarda, glomerüler endotelyal hücrelerde, proksimal tubuler hücrelerinde, henle kulpunun çıkan kalın kolunda ve toplayıcı kanallarda, nöronal nitrik oksit sentaz'ın ise makula densa, toplayıcı kanalın prinsipal hücreleri ve renal pelvik sinirlerde bulunduğu tespit edilmiştir. iNOS ise proksimal tubullerde, distal tubullerde ve toplayıcı kanallardaki hücrelerde, kısaca makula densa ve damarlar hariç genel olarak geniş bir alanda bulunmaktadır (103,122). İzole perfüze obstrükte tavşan böbreğinde PGE2'nin bradikininee stimule edilen salınımı spesifik bir iNOS ihbitörü olan aminoguanidin tarafindan azaltılmıştı. Bu çalışmalar obstrukte tavşan böbreğinde aktif iNOS varlığını göstermektedir(125); bu sonuçlar ratlarda ve farelerde doğrulanmıştır(124). Başka bir çalışmada köpeklerde 140 dakikalık unilateral üreteral obstrüksiyon (UÜO) da bir siklooksijenaz inhibitörü varliginda L-arginin verilmesi, renal kan akımı ve üreteral basınç değerlerini düzeltti. İlginç olarak, UÜO yokluğunda L-arginin verilmesi, prostaglandin sentez inhibisyonu olsun ya da olmasın, renal hemodinamiği değiştirmedi. Bu çalışmada, UÜO oluşturduktan sonra NO prekürsörü olan arjinin verilmesiyle NO yolağını aktive etmişlerdir. Bunuda glomeruler hidrostatik basınçtaki yükselme ile göstermişlerdir. Sham operasyonu uygulanmış köpeklere arginin verilmesi renal kan akımında bir değişikliğe yol açmamıştır. Buna karşın, obstruksiyon varlığında, arginin verilmesi renal kan akımında bir artışa yol açmaktadır. Bu, obstrüksiyonda NOS sisteminin aktive olduğunu doğrular ve ayni zamanda UÜO da arginin deplesyonunun renal kan akımındaki azalmalara katkıda bulunabileceğini gösterir (127).

Canton ve arkadaşları üreteral oklüzyon sonrası glomerular hidrostatik kapiller basınçta bir artış olduğunu göstermişlerdir(128). Basınçtaki bu artış NO'nun izole damarlarda ki bilinen salınım mekanizmasında olduğu gibi, endoteli fiziksel olarak sıkıştırarak NO salınımının stimüle olmasını sağlayabilir(129).

2.6 METİL ARJİNiNLER

2.6.1 METİL ARJİNİNLERİN OLUŞUMU VE ÇEŞİTLERİ

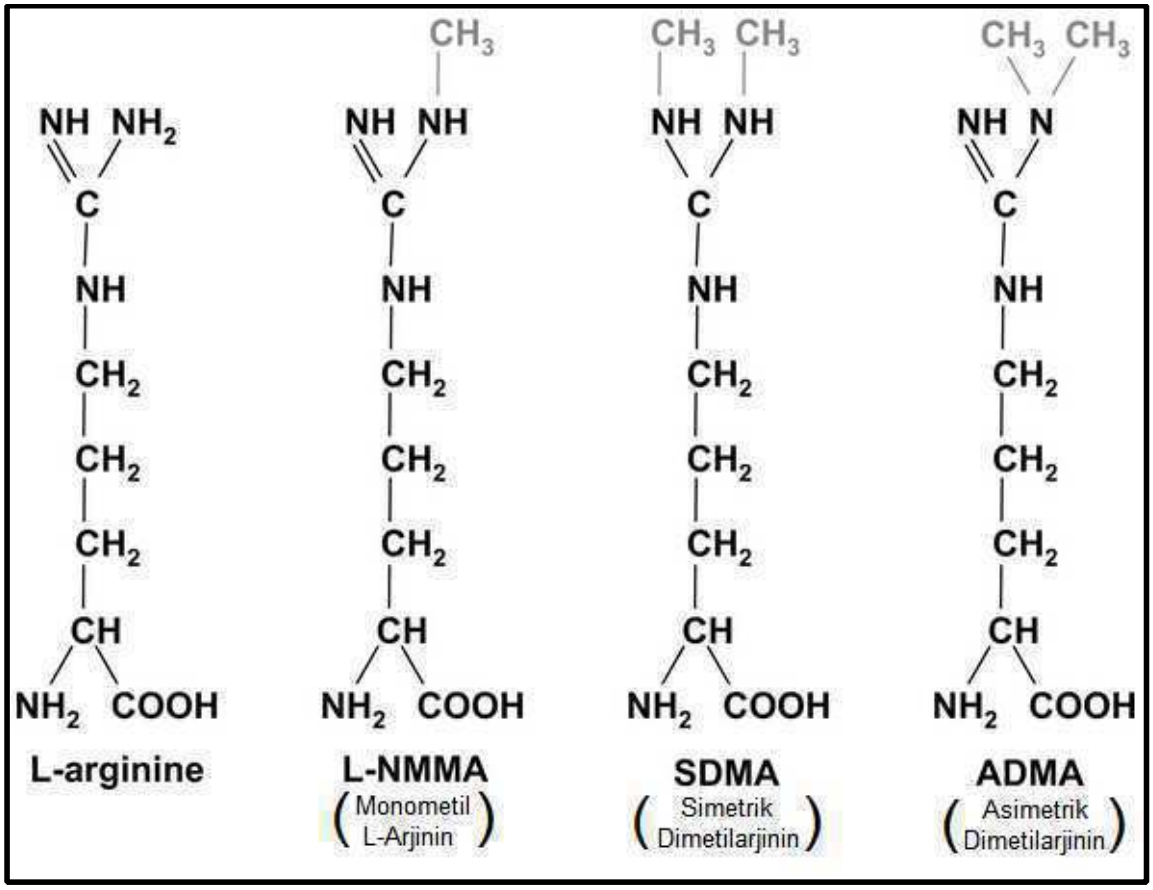
Metil arjininler, proteinlerde bulunan arjinin rezidülerinin metilasyonu sonucu oluşurlar. Bu proteinler yaygın olarak nükleusta bulunurlar. Protein-arjinin metilasyonu, proteinlerin içindeki arjininin guanidino azotuna 1 veya 2 metil gruplarını aktaran bir posttranslasyonel modifikasyondur (130,131).

İnsanlarda protein-arjinin metilasyonu protein arjinin metil transferazlar (PRMT) tarafından gerçekleştirilir. PRMT'nin iki geniş tipi vardır, insanlarda PRMT aktivitesi gösteren 9 adet PRMT vardır. PRMT 5,7,9 PRMT II olarak diğer PRMT'ler PRMT I olarak bilinir (132). TipI PRMT en çok rastlanan PRMT'dir, çok sayıda proteine spesifik farklı tipleri vardır. Kardiovasküler sistemde kalp, düz kas hücreleri ve endotelyal hücrelerde expresse edilir. Expresyon paterni hakkında ayrıntılı bilgi olmamakla birlikte PRMT I'in bütün tipleri (1,3,4 ve 6) vasküler hücrelerde ekspresse edilir. PRMT I ekspresyonu LDL ile artırılmaktadır. Tip I PRMT aktivitesi sonucu oluşan ürün asimetrik dimetil arjinin (ADMA) ve Nmonometil L-Arjinindir. NOS'u inhibe edebilme özelliği vardır. Artan LDL ile birlikte artmış tip I PRMT ekspresyonu ile ADMA düzeylerinin LDL ile pozitif korelasyonu olduğu gözlemlenmiştir. Endotelyal hücre kültürlerinde LDL, oxLDL konsantrasyonu artışı PRMT gen ekspresyonu artısına neden olur (133).

Tip II PRMT simetrik dimetilarjinin (SDMA) oluşumunda rol oynar. SDMA'nın NOS'u inhibe etme özelliği yoktur. Proteinler hidrolize uğradığında onların metillenmiş arjinin rezidüleri serbest kalır, metillenmiş arjininler idrarla

atılır. Renal yetmezlik hastalarında metillenmiş arjininler idrarla atılamaz seviyeleri yükselir. Metil arjininler böbrekte dimetilarjinin metil transferazla, karaciğerde asetilasyonla metabolize edilir.

PRMT'ler protein metilasyonunda metil vericisi olarak S-Adenozil Metionini (SAM) kullanır. SAM artışı PRMT aktivasyonunu artırırken, S-Adenozil Homosistein (SAH) artışı PRMT'yi inhibe eder (134). PRMT'ler yoluyla proteinlerin metilasyonu ve oluşan metil arjinin türevleri şekil 10'da gösterilmektedir.



The lung in the balance: arginine, methylated arginines, and nitric oxide Raed A. Dweik American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular PhysiologyPublished 1 January 2007Vol. 292no.L15-L17

Şekil 10: Arjinin ve metil arjinin türevleri

ADMA metillenmiş arjinin rezidüleri içeren proteinlerin katabolizması sonucu meydana gelir. Hücresel proteinlerin arjinin metilasyonu PRMT'ler tarafından katalize edilir (135).

2.6.2 ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN (ADMA)

Asimetrik N_G, N_G dimetilarjinin, L-Arjininin guanidin analoğu; endojen olarak sentezlenen, proteinlerdeki arjinin rezidülerinin protein arjinin metil transferazlarıyla (PRMT I) metillenmesiyle meydana gelen bir türev aminoasittir. Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) endojen nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) inhibitörüdür. ADMA'nın kan düzeyi arttıkça NO sentezi azalmaktadır. ADMA NOS'un endojen inhibitörü iken SDMA'nın NOS enzimi üzerine inaktive edici etkisi yoktur fakat arjinin ve ADMA ile hücre giriş yolunu etkileyerek NO üretim hızında dolaylı yoldan etkisi vardır (136). 3 adet metilarjinin (ADMA, SDMA ve L-NMMA) Y taşıyıcı protein adı verilen katyonik aminoasit taşıyıcıları aracılığıyla endotelyal hücrelerin içine girerler. Metil arjininler birbirleriyle ve arjinin aminoasidi ile hücre içine giriş için yarışırlar. Yüksek konsantrasyondaki ADMA, L- Arjininin hücre içine transportunu engeller. Sonuç olarak NO sentezi azalır (136).

ADMA kan basıncını yükseltir, vazokonstrüksiyona neden olur, endotel bağımlı relaksasyonu bozar, endotelyal hücre adhezivitesini artırır. Kardiak outputu azaltır. Uzamış NOS inhibisyonu sonucu olarak sol ventrikuler hipertrofi gelişir. Böbrek yetmezliğinde ADMA birikimi olur. Plazma ADMA seviyeleri ile endotel disfonksiyonu arasında ilişki vardır. Hemodiyaliz hastalarında gelişen endotel disfonksiyon kardiyovasküler olaylar ve mortaliteden sorumlu faktörlerden biriside ADMA'dır (136).

Endotel kaynaklı NO endotel fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemlidir. NO'nun vazodilatasyon, antitrombotik süreç ve inflamasyonun kontrolünde kritik rolleri vardır. NO biosentezinin bozulması endotel fonksiyonunun bozulmasıyla beraber çok sayıda vasküler hadiseyle birliktedir. ADMA arjininden NO sentezini

kompetetif olarak inhibe eder. ADMA endotel fonksiyon bozukluğundan sorumlu faktörlerden birisidir. ADMA yüksekliği ve endotel fonksiyon bozukluğu ile seyreden çeşitli klinik durumlar; konjestif kalp yetmezliği, diyabet, insulin rezistansı, hipertansiyon, hiperhomosisteinemi, son dönem böbrek yetmezliği olup bu hastalıklarda akut vasküler olaylar sonucu ölüm sık görülür (136).

2.6.2.1 ADMA METABOLİZMASI

Metilarjininlerin bir kısmı renal yolla atılır. Bununla birlikte SDMA tamamıyla renal yolla atılır fakat ADMA ve L-NMMA yaygın olarak metabolize edilir. En önemli metabolik yol dimetilarjinin dimetil amino hidrolaz (DDAH) enzimiyle sitrülin ve dimetilamine yıkılmasıdır (137,138).

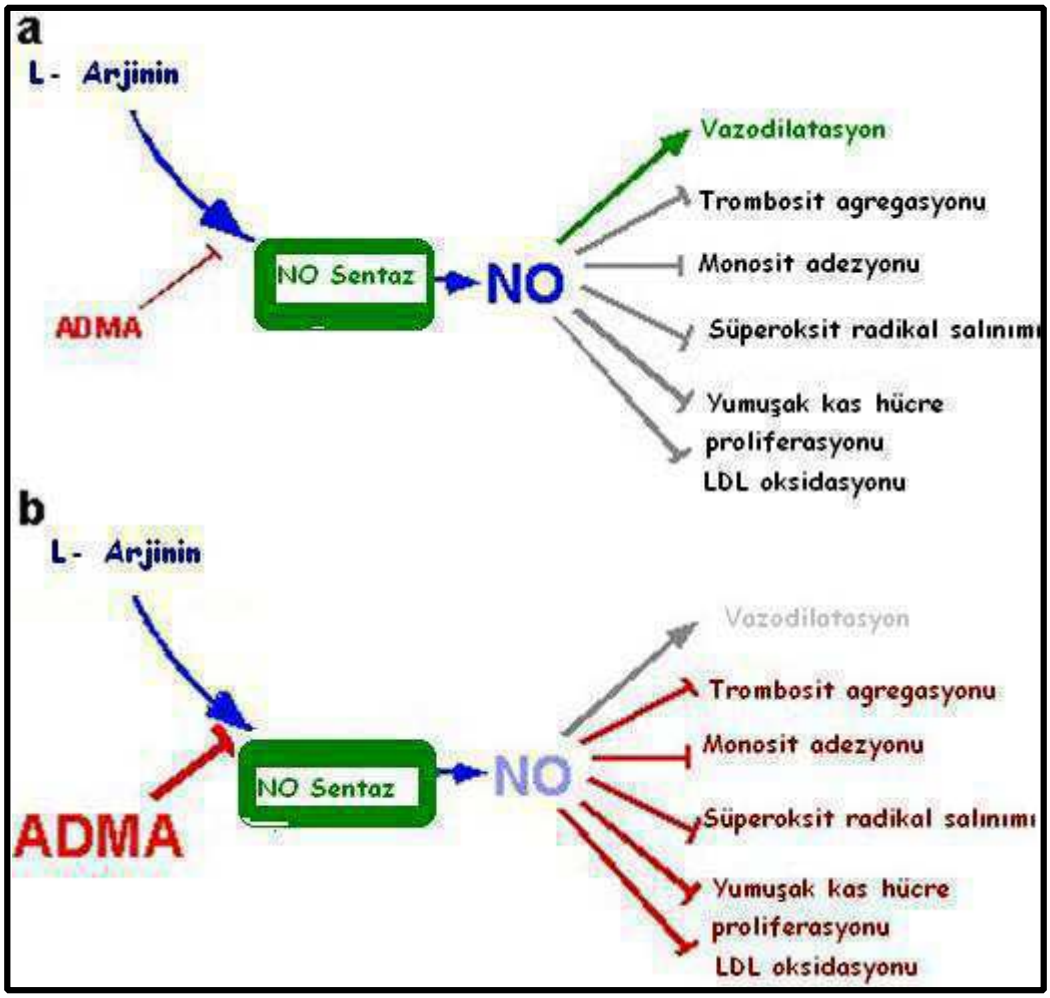
DDAH, ADMA seviyelerini regüle etmede önemli rol oynar. SDMA intravenöz olarak enjekte edilirse %60 oranında idrara çıkar, fakat ADMA intravenöz olarak enjekte edildikten sonra %5 oranında idrara çıkar. Bu nedenle renal yetmezlikte SDMA ADMA' ya göre plazmada çok daha yüksek seviyelerde bulunur. Yapılan araştırmalar ADMA'nın DDAH için substrat olduğunu, SDMA'nın olmadığını göstermiştir. ADMA'nın SDMA'ya göre yaygın bir metabolizmasının olduğu gösterilmiştir (139). DDAH iki izoformdan oluşur her ikisi de vasküler endotelyumdan eksprese edilir. İnsanları da kapsayan gelişmiş organizmalarda DDAH enziminin 2 izoformu tanımlanmıştır. DDAH 1'i kodlayan gen 1. kromozomda lokalize olmuş iken DDAH 2'yi kodlayan gen 6. kromozomda lokalizedir. Bu izoformlar farklı doku dağılımları göstermelerine rağmen aktiviteleri benzerdir. DDAH 1 ekspresyonu ile nöral NOS arasında, DDAH 2 ile endotelyal NOS arasında ilişki vardır fakat NOS eksprese eden doku ve hücrelerde DDAH'lar fazlaca eksprese edilmesine rağmen bu doku ve hücrelerle sınırlı değildir. Her iki izoform da kardiovasküler sistemde identifiye edilmesine rağmen muhtemelen DDAH 2 ekspresyonu çok daha fazladır (140,141).

Bazı araştırmacılar çalışmalarında hipoksiye maruz bırakılan domuzlarda DDAH aktivitesinin baskılandığını göstermişlerdir. DDAH 1 ve DDAH 2 farklı doku dağılımları göstermektedir. DDAH 2 aktivitesi ve ekspresyonu yeni doğanların primer pulmoner hipertansiyonunda azalmıştır. Bu da bu hastalarda NOS aktivitesinin azalmasını ve ADMA seviyelerinin yükselmesini açıklamaktadır (142).

Endotelyal hücre kültürlerinde DDAH'ın selektif inhibisyonu nitrik oksit sentezinde azalmaya yol açar. Ortamın arjinin muhtevasının artırılması bu durumu tersine çevirebilir (143). PRMT'ler yoluyla ADMA oluşumu ve atılım yolları şekil 12'de gösterilmektedir.

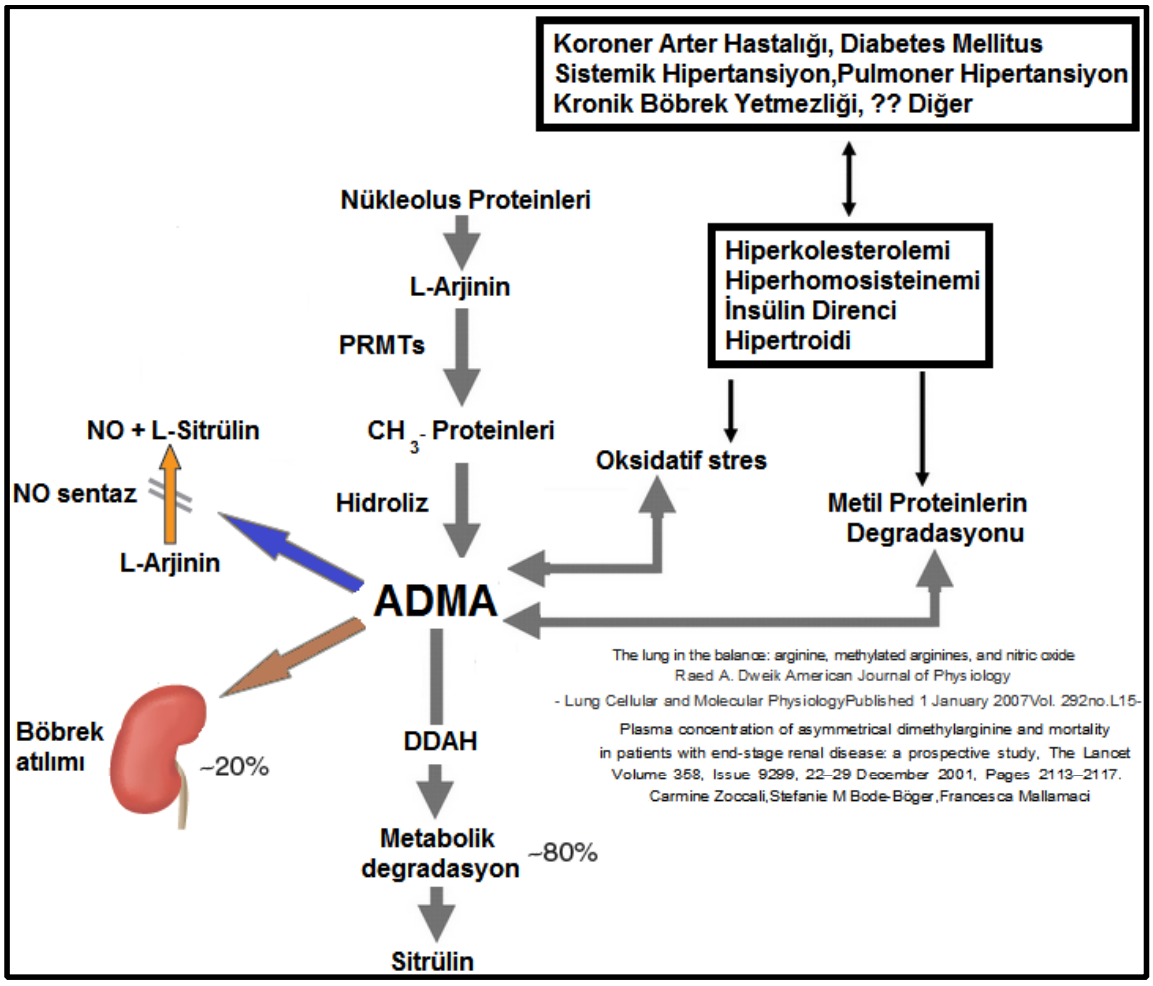
ADMA konsantrasyonu yüksek olan hastalara L-arjinin verilmesi NOS enzim aktivitesinde artışa neden olur. Yapılan bazı çalışmalarda dışarıdan L-arjinin verilerek, endotel fonksiyonun önemli derecede düzeldiği, ADMA'nın zararlı etkilerinin ters çevrildiği gösterilmiştir. Yine yüksek ADMA konsantrasyonuna sahip kalp yetmezliği olan hastalara L-arjinin suplemantasyonu L-arjinin/ADMA oranını 2 kat arttırmış ve endotele bağlı vazodilatasyon düzelmiştir. Sağlıklı bireylerde dışardan L-arjinin verilmesi endotele bağlı vazodilatasyonu etkilememiştir (144).

Oksidatif stres ADMA katabolizmasından sorumlu olan DDAH enziminin aktif bölümünde sistein aminoasitine zarar vererek enzim aktivitesini azalmaktadır. Böylece ADMA'nın yıkımı azalırken kan düzeyi de artmaktadır (145). Bu nedenle oksidatif stresi arttıran birçok dejeneratif hastalıkta ADMA düzeyi yüksek bulunmaktadır.



Şekil 11: ADMA ve L- arjinin konsantrasyonlarının oranlarına bağlı olarak vasküler fonksiyonlarda NOS'ın aktivitesi (a: Sağlıklı bireylerde; b: ADMA seviyesi yükselmiş hastalarda, ADMA aracılığıyla nitrik oksit sentazın inhibisyonu ve hücre etkileşiminde NO' nun çeşitli inhibitör etkileri)

(Palmer, R.M.J., Moncada, S., "A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vasculer endothelial cells", Biochem. Biophys. Res. Commun., 158; 348-352 (1989).)



Şekil 12: ADMA metabolizması

2.6.2.2 ADMA ve Böbrekler

Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda yapılan çalışmalarda ADMA düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur. Böbrek yetmezliği olan hastalarda biriken ADMA miktarı ile gelişen endotel disfonksiyonu arasında ilişki gösterilmiştir.

221 kronik böbrek yetmezliği olan bir hasta grubunda yapılan bir çalışmada, serum ADMA ve SDMA düzeylerinin yükseldiği, ancak bu artışın kardiovasküler olay gelişimi ile pozitif korele olmadığı düşünülmüştür (146). Bununla birlikte, böbrek yetmezliği olan 131 hasta ve mortalite arasında ilişki gösterilmiştir (147). 246 diyaliz hastasında yapılan bir başka çalışmada ise

ADMA'nın C-reaktif protein (CRP) ve β-natriüretik Peptid (BNP) ile birlikte aterosklerotik komplikasyonların önlenmesi ve saptanmasında kullanılabileceği düşünülmüştür (148).

Yılmaz ve arkadaşlarının böbrek transplantının ardından 1,3,7,14 ve 28.günlerde hastaların plazma ADMA düzeylerinin düşmesi ile endotel fonksiyonların düzelmesi ile ilişkili çalışmaları vardır. Bu çalışmada hsCRP ve ADMA'nın transplantasyonun ardından düştüğü gösterilmiştir (149).

İnsanlarda günde yaklaşık 300 mikromol(60mg) ADMA oluşturulmakta, bunun da yaklaşık 250 mikromol'u DDAH tarafından metabolize edilmekte ve çok az kısmı da böbrekler tarafından değiştirilmeden atılmaktadır (154). DDAH ve NOS' un renal tübüler hücrelerde ve glomeruluslardaki endotelyal hücrelerde lokalize olduğu bulgusu intrasellüler ADMA konsantrasyonunun böbreklerdeki NO oluşturan endotelyal hücreler tarafından regüle edildiği hipotezini desteklemektedir (151). Bu nedenle DDAH'dan zengin renal dokunun hasarı ADMA degradasyonunu bozabilir. Yapılan çalışmalarda ADMA'nın dolaşımdan major uzaklaştırıcı bölgenin böbrekler olduğu gösterilmiştir.

Plazma ADMA konsantrasyonlarının, renal hastalığın erken dönemlerinde arttığı bulunmuştur ve böbreğin kendisi ADMA metabolizmasında önemli bir organ gibi görünmektedir (150-152). Aynı zamanda kandaki artmış ADMA seviyesinin kronik böbrek hastalığının ilerlemesine katkıda bulunduğu önerilmiş, fakat şimdiye kadar sadece deneysel verilerin varlığı bu hipotezi desteklemiştir (153).

Hemodiyaliz hastalarında gelişen endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler olaylar ve mortalitede ADMA nın sorumlu faktörlerden birisi olabileceği ileri sürülmektedir. Hemodiyaliz ile ADMA nın vücuttan uzaklaştırılabildiği fakat hemodiyaliz sonrası hemen yüksek değerlere geri döndüğü gösterilmiştir (136).

Subresör dozda ADMA infüzyonunun insanlarda efektif renal kan akımını azalttığı gösterilmiştir (159). Düşük baskılayıcı dozlarda efektif renal kan akımını ve kardiyak outputu düşürdüğü gösterilmiştir (160).

Yapılan çalışmalar renal fonksiyondaki azalma ile plazma ADMA seviyelerindeki artışı defalarca doğrulamıştır.(161) Bununla birlikte bu ilişkideki nedensellik kanıtlanamamıştır. En son çalışmalarda ADMA'nın sadece glomerüler filtrasyon hızı ile ters ilişkili değil aynı zamanda son dönem böbrek yetmezliğinin ilerlemesinde ve mortalitesinde bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (162). Düşük veya orta düzeydeki böbrek hastalıklarında, hastalığın ilerlemesinde, artmış plazma ADMA seviyelerinin bağımsız bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (163). Araştırmacılar, plazmadaki artmış ADMA seviyelerinin renal (vasküler) hastalığı ilerletebileceği konusunda tahminde bulunmuşlardır. Artmış plazma ADMA düzeyinin GFR'yi etkileyerek renal fonksiyonda azalmaya yol açtığı ve renal fonksiyon kaybının ilerlemesine katkıda bulunduğu olasıdır.

Her ne kadar ADMA'nın plazma klirensini anlayışımız geşilmeye devam etse de bazı yazarlar ADMA'nın artmış düzeylerinin renal atılımdaki kayıptan kaynaklandığını düşünmektedirler(156,164). ADMA ve SDMA'nın plazma düzeylerini sürdürmede böbreğin atılım ve yapay rolünün belirlemek için, sıçanlar üzerinde bilateral nefrektomi, üretral kesi, üretral oklüzyon protokolleri gibi çalışmalar yapılmıştır. Nefrektominin akut olarak plazma ADMA seviyesini azaltmakta olduğu ve renal atılım fonksiyonu ADMA klirensi için gerekli değilken, SDMA klirensi için gerekli olduğu bulunmuştur (165).

3- MATERYAL VE METOD

3.1 Deney Hayvanları

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınarak Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesinde Deney Hayvanı araştırılması için ayrılan bölümde gerçekleştirildi. Çalışma Trakya Üniversitesinden temin edilen 21 adet adolesan dönemdeki (ortalama 6 haftalık) Spraque-Dawley tipi erkek sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Ratların ağırlıkları 190-292 gr arasında değişmekte olup ortalama ağırlıkları 240 gramdı. Hayvanlar sabit sıcaklık(18-21C) ve nem oranında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olan standart laboratuvar ortamında barındırıldılar. Her kafeste 3-4 rat olmak üzere sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendiler. Barınma süresince deney hayvanları standart beslenme, barınma ve bakım koşullarına tabi tutuldular ve deney hayvanlarına standart dışı kısıtlama uygulanmadı.

Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Ratlar toplam 3 gruba ayrıldılar. Cerrahi sırasında mikro cerrahi setler kullanıldı.

Grup 1: Kontrol grubu. Herhangi bir işleme tabi tutulmadı (6 rat).

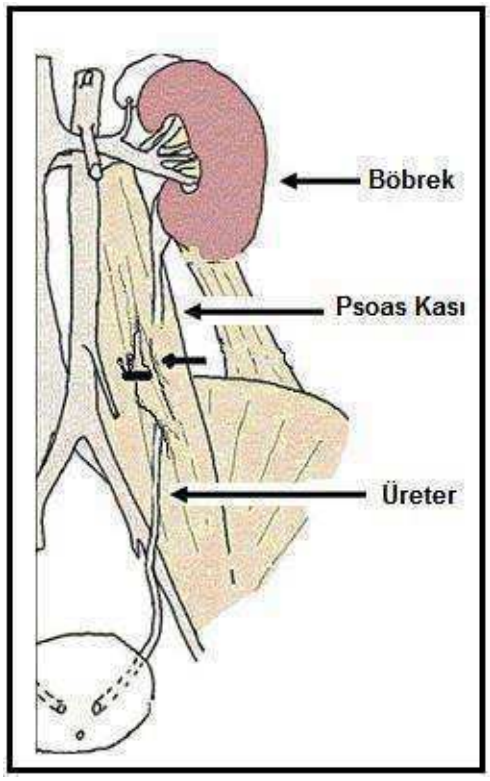
Grup 2: Sham grubu. Deney grubu ile aynı şekilde ama üreter ve psoas kas diseksiyonu olmadan yapıldı, (6 rat).

Grup 3: Parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon (PUÜO) oluşturulan grup. (9 rat).

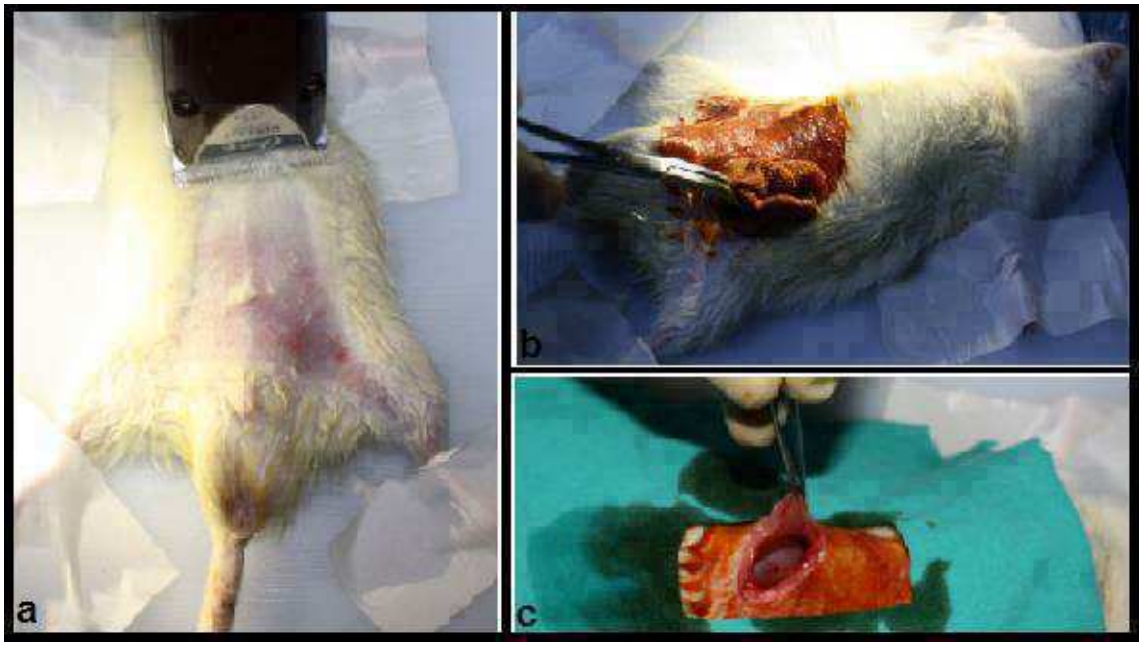
3.2 Cerrahi İşlem

Deneysel parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon (PUÜO) oluşturulacak ve sham operasyonu uygulanacak ratların tümü işlemden 6 saat öncesinden başlayarak sadece su içmelerine izin verilerek aç bırakıldı. Ratlar antisepsi kurallarına uyulup, vücut ısıları korunarak laboratuvar şartlarında operasyona alındı. Gruptaki hayvanların herbirine 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı) kas içine verilerek genel anestezi sağlandıktan sonra tüm ratlar sırt üstü yatırıldı. Batın orta hat çizgisi, her iki yanda 2'şer cm'lik alan traş edilerek tüylerden arındırıldı. Cerrahi alan açığa çıkarıldıktan sonra % 10 Povidone Iodine ile uygun saha temizliği yapılıp yalnızca cerrahi alan açıkta kalacak şekilde batın steril örtülerle kapatıldı.

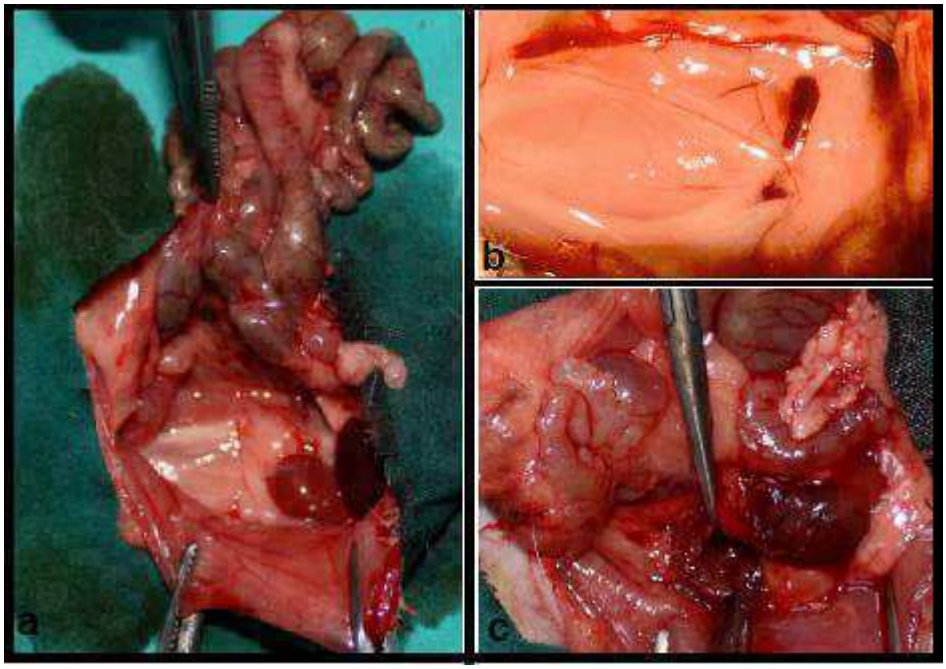
Parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon (PUÜO) modeli: Steril cerrahi aletlerle karın ön yüzüne 2 cm'lik bir insizyon uygulandı. Linea alba üzerinden cilt, cilt altı, karın ön duvarı ve periton geçilerek batın içerisine ulaşıldı. Barsaklar mediyale devrilerek sol böbrek bulundu, yağ ve bağ dokuları diseke edilerek sol üreter ve psoas kası ortaya konuldu. PUÜO oluşturulacak gruplardaki ratlarda Ulm ve Miller'ın tekniğe benzer (166) sol üreter altındaki psoas kası longitudinal olarak bir oluk şeklinde diseke edildi (~ 15 mm) ve sol üreterin küçük bir kısmı içine yerleştirildi. Daha sonra psoas kasının kenarları üreter üzerinden 5/0 ipek sütür ile yaklaştırıldı. Üreter böylece bir tünel içerisine gömüldü. Daha sonra 3/0 katgüt ve 3/0 ipek sütürler ile batın 2 tabaka halinde kapatıldı. Tüm ratlar 12 hafta sonra sakrifiye edildi.



Şekil 13: Parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon (PUÜO) modelinin anatomik gösterimi



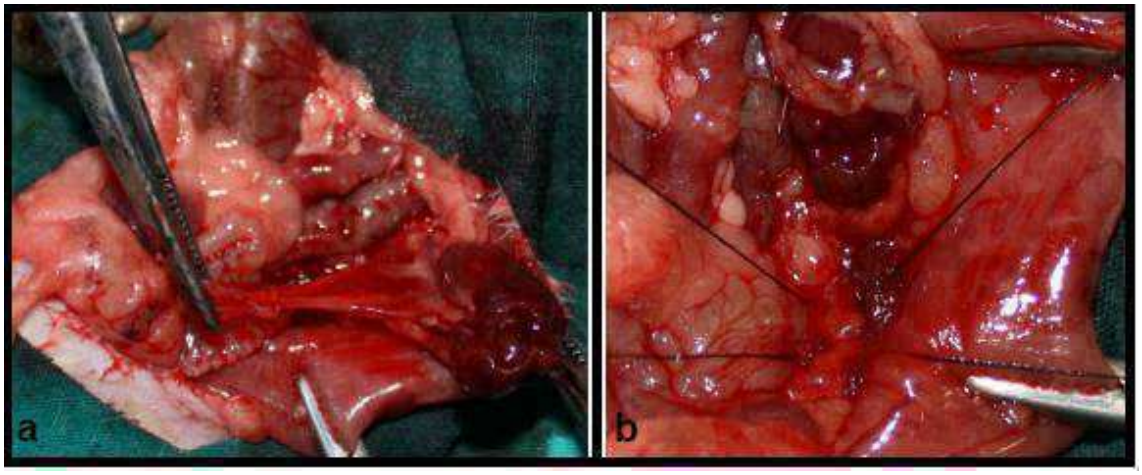
Şekil 14: a: Batın orta hat çizgisinin traş edilerek tüylerden arındırılması
b: % 10 Povidone Iodine ile uygun saha temizliği yapılması
c: Cilt, cilt altı, karın ön duvarı ve periton geçilerek batın içerisine ulaşılması



Şekil 15: a: Barsaklar mediyale devrilerek sol böbrek bulunması

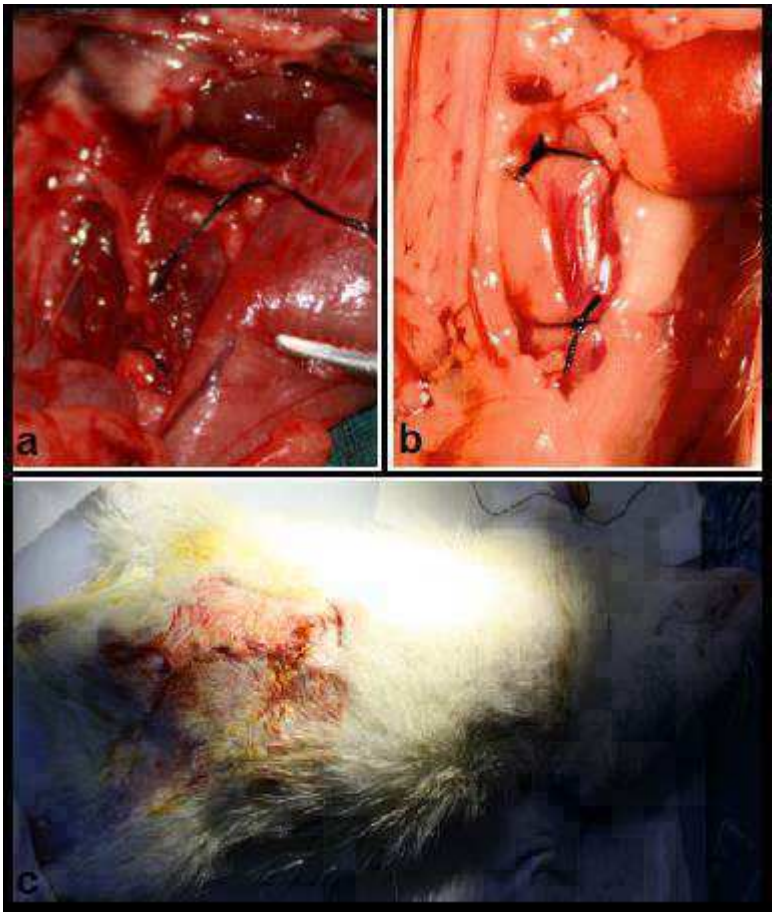
b:Yağ ve bağ dokuları diseke edilerek psoas kasının ortaya konulması

c: Psoas kasının longitudinal olarak bir oluk şeklinde diseke edilmesi (~ 15 mm)



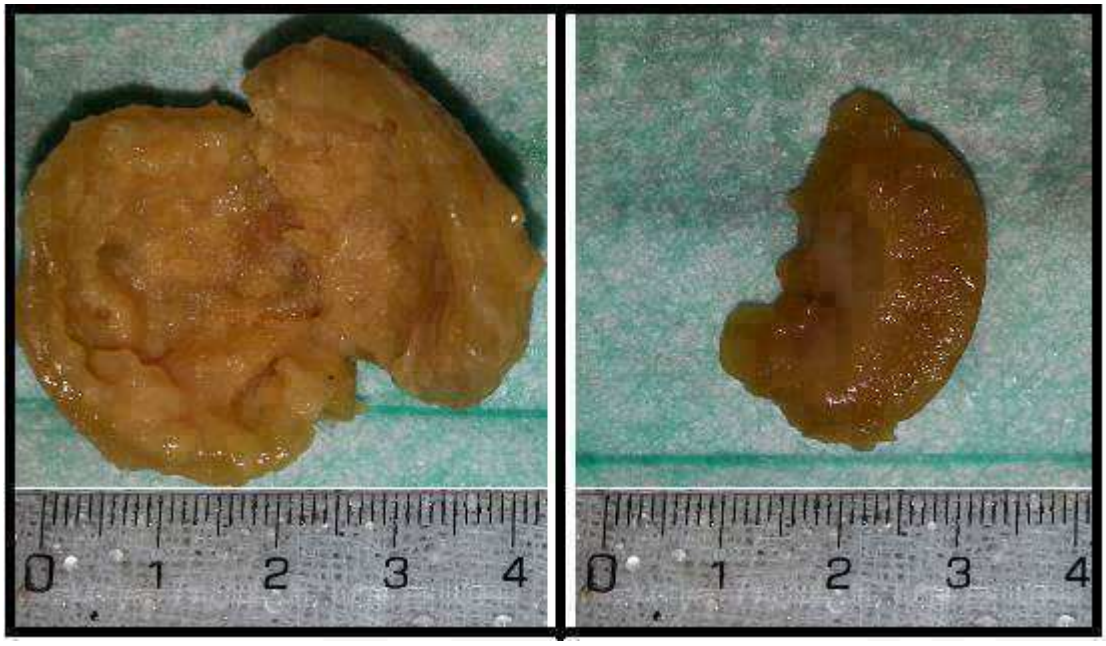
Şekil 16: a: Sol üreterin ortaya konulması

b: Sol üreterin küçük bir kısmının psoas kası içine yerleştirildikten sonra psoas kasından 5/0 ipek ile sütür geçilmesi



Şekil 17: a ve b: Psoas kasının kenarlarının üreter üzerinden 5/0 ipek sütür ile yaklaştırılması

c: 3/0 katgüt ve 3/0 ipek sütürler ile batının kapatılması



Şekil 18: Deney ve kontrol grubuna ait böbreklerin makroskopik görünümü

Sham modeli: Steril cerrahi aletlerle karın ön yüzüne 2 cm'lik bir insizyon uygulandı. Linea alba üzerinden cilt, cilt altı, karın ön duvarı ve periton geçilerek batın içerisine ulaşıldı. Barsaklar mediyale devrilerek sol böbrek bulundu, yağ ve bağ dokuları diseke edilerek sol üreter ve psoas kası ortaya konuldu. üreter ve psoas kas diseksiyonu olmadan işem sonlandırıldı. Daha sonra 3/0 katgüt ve 3/0 ipek sütürler ile batın 2 tabaka halinde kapatıldı. Tüm ratlar 12 hafta sonra sakrifiye edildi.

3.3 Biyokimyasal İnceleme Yöntemi

Böbrek diseke edilip, eksize edildikten sonra –80 derecede saklandı. Biyokimyasal değişiklikleri testip etmek için böbrekte SOD (Superoksit Dismutaz) enzim aktivitesi ve NO son ürünü olan nitrit ve nitrat tuzlarının düzeyleri saptandı. Plazmadaki nitrit-nitrat ve ADMA düzeyini incelemek için ventrikül içinden 5cc alınan kan örnekleri çalışıldı ve daha sonra tüm ratlar sakrifiye edildi.

Doku Homojenizasyonu: Doku örnekleri tartıldıktan sonra total nitrit/nitrat ve süperoksid dismutaz (SOD) tayinleri için, %0,9 NaCl içerisinde homojenize edilip, %10'luk homojenatlar hazırlandı. Elde edilen doku homojenatları daha sonra 30 saniye aralıklarla, orta şiddette iki kez sonike edildi. Homojenizasyon ve sonikasyon işlemleri yaklaşık 4C'de soğuk ortamda yapıldı. Sonikasyon işleminden sonra, total nitrit/nitrat ve SOD tayinleri için, hazırlanmış homojenatlar 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Her iki tayin de süpernatantlardan alınan örneklerde yapıldı.

Nitrit/nitrat

Nitrat, nitrat redüktaz enzimi ile ve NADPH varlığında nitrite indirgenir.

$$\text{Nitrat} + \text{NADPH} + H^{+} \xrightarrow{\text{nitrat redüktaz}} \text{Nitrit} + NADP^{+} + H20$$

Nitritin sülfonilamid ve N-1_naftil etilendiamin dihidroklorid ile reaksiyona girmesi sonucu kırmızı-mor renkli diazo bileşiği oluşur. Oluşan diazo bileşiğinin 540 nm dalga boyunda okunur. Bu işlemle total nitrit ve nitrat düzeyi tayin edilmiş olunur. Ayrıca nitrat redüktaz reaksiyonunu oluşturmadan plazma nitrit düzeyi direkt reaksiyonel oluşan renkli diazo bileşiğinin yine 540nm'de köre karşı spektrofotometrik değerlendirmesinden hesaplanır.
Yöntemin uygulanışı Boehringer Mannheim ''nitric oxide colorimetrik assay'' kiti kullanılmıştır.

	Kör nitrit (µl)	Örnek kit (µl)	Kör nitrit + nitrat(µl)	Örnek nitrit + Nitrat (µl)
Örnek	-	500	-	500
Distile su	770	270	500	-
Reaksiyon karışımı 2	-	-	250	250
Çözelti 3	-	-	20	20
Oda ısısında 30dk beklenir ve süre sonunda A1 okuması yapılır.				
Renk reaktifi 1	250	250	250	250
Renk reaktifi 2	250	250	250	250
Karanlıkta 15 dakika bekletilip, süre sonunda A2 okuması yapılır				

Hesaplama = (A2-A1)nitrit-(A2-A1)kör nitrit
Nitrit+nitrat= (A2-A1)nitrit+nitrat-(A2-A1)kör nitrit+nitrat
Nitrat = Anitrit+nitrat-Anitrit
Hesaplamalar standart eğrisi kullanılarak yapılır.

Doku SOD aktivitesi tayini

Süperoksid serbestleştirici olarak kullanılan ksantin/ksantin oksidaz sistemiyle nitroblue tetrazolium indirgenmesinin SOD tarafından inhibisyonuna dayanır. 1Ü SOD aktivitesi nitroblue tetrazolium indirgenmesini %50 inhibe eden protein konsantrasyonu olarak ifade edilir (101).

Reaksiyon karışımı: 40ml ksantin, 20 ml EDTA 20ml nitroblue tetrazolium, 12 ml sodyum karbonat 6 ml bovin serum albumin karıştırılır ve pH=10,2'ye ayarlanır.

Ksantin oksidaz çözeltisi: 0,167 U/ml

	Örnek (µl)	**Kör** (µl)
Reaksiyon karışımı	2850	2850
Süpernatant	150	-
Kasntin oksidaz	50	50
25C'de 20 dk inkübe edilir		
CuCl2	50	50

Spektrofotometride 560 nm dalga boyunda suya karşı formazon oluşumu ölçülür

Hesaplama:

$$\%\ _{inhibisyon} = \frac{(A_{kör} - A_{örnek})}{A_{kör}} \times 100$$

Doku SOD aktivitesi sun yöntemi modifiye edilerek ölçülmüştür.

ADMA

KAN ÖRNEĞİ ANALİZLERİ

Alınan kan örneklerinde çalışılacak ADMA (asimetrik dimetilarjinin) analizleri için ventrikül içinden alınan kandan, tüplere alınan 5 cc kan örneği 3,000 × g de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Ayrılan örnekler çalışma gerçekleştirilinceye dek –40 °C de saklanmıştır.

ADMA nın serumdaki miktarını ölçmek için çalışmamızda BioVendor Research and Diagnostic Products (Cat.No: REA 201/96) manifactured by DLD Diagnostica GMBH / germany) kiti kullanılmıştır. Yarışmalı tipte bir ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kiti olan ADMA Kiti, ADMA düzeylerinin serum ve plazma örneklerinde kantitatif ölçümü için uygundur. ELISA çalışması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D. Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

ELİSA (Enzim Linked İmmunoSorbent Assay)

ELISA yöntemi, 1960'lı yıllarda Radioimmunoassay yöntemlerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Radioimmunoassay yöntemini radyoaktif madde ile işaretlemeyi gerektirir ve ciddi bir atık sorununu beraberinde getirir. Oysa ELISA yönteminde işaretleme enzimlerle yapılır ve atık problemi yoktur, kullanılan reaktiflerin yarı ömürleri uzundur.

ELISA yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugat ve enzim subtratı kullanılarak renklendirilmesi esasına dayanmaktadır. Yöntem; antijen, antikor ve haptenlerin saptanmasında kullanılan kantitatif bir tekniktir.

ELISA'nın son zamanlarda yaygın olarak kullanılması, monoklonal antikorların yaygınlığına ve hem otoimmün hem de infeksiyöz hastalıklar için birtakım rekombinant spesifik antijenlerin geliştirilmiş olmasına bağlanmaktadır. ELISA'da kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olmaları, atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması, basit testler olması, otomatize edilebilmesi ve ticari plak okuyucuları ile bir dakikada değerlendirilebilmeleri bugün laboratuarda kullanılan birçok tekniğe olan üstünlükleridir. ELISA'nın laboratuarda çok fazla örnekle çalışma imkanı verdiği gibi analizlerin kısa sürede sonuçlanması gibi üstünlükleri de vardır. Hepatit, AIDS, kızamık gibi hastalıkların, hormonlar, kanser markerleri, hematolojik ve bakteriyolojik

determinantların tanısında ve birçok klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır.

ELISA Bileşenleri

Genel olarak 6 farklı ELISA protokolünden bahsedilebilir. Yarışmacı olan (kompetitif) ve olmayan ELISA testleri vardır. Yarışmacı ELISA genellikle antijen varlığını göstermek için kullanılır. Aranan antijene özgül antikor katı faza bağlanmıştır. Enzimle işaretli antijen ve test edilecek antijen (klinik örnek) katı fazdaki antikora aynı zamanda eklenir ve her iki antijenin de antikordaki bağlanma bölgeleri için yarışması amacıyla inkübe edilir. İnkübasyondan sonra yıkanarak bağlanmamış antijenler uzaklaştırılır ve enzim substratı konarak inkübe edilir. Bağlanmış enzim substratla reaksiyona girerek renk oluşturur, spektrofotometrede absorbans okunur. Substratın hidroliz miktarı, örnekteki antijen miktarı ile ters orantılıdır. Yani sonuçta renk değişikliği olmazsa bu klinik örnekte antijen varlığını gösterir.

Bütün ELISA testleri kompleks, birden fazla içeriği olan sistemlerden oluştuğundan ve bu içeriklerin duyarlı ve kesin sonuçlar alınmasını direkt etkilemelerinden dolayı, test parametrelerinin ve içeriklerinin dikkatlice seçilmesi gerekmektedir.

i. Katı faz

İmmünreaktiflerin antijen ya da antikorun bağlandığı katı faz, daha sonra oluşacak olan antijen-antikor reaksiyonlarının kendine bağlı kalmasını sağlar. Katı faza bağlanmayı etkileyen faktörler şunlardır; katı fazın yapısı, antijenin fiziksel özellikleri, izoelektrik noktası, kimyasal yapısı, immünreajenlerin konsantrasyonu ve saflığı, kaplama için gerekli ısı ve inkübasyon periyodu, kaplama solüsyonunun iyonik gücü ve pH'dır.

ii. Konjugat

Yönteme bağlı olarak ELISA, enzimle işaretli antijen veya antikor içermelidir. Konjugat kullanılırken antikorun enzimle işaretlenmesi kolay olduğu için daha sıklıkla antikor kullanılır. Klinik immünoloji laboratuarlarında en yaygın olarak kullanılan enzimler alkaline fosfataz ve horseradish peroksidaz'dır. Bunun dışında ß galaktosidaz, glukoz oksidaz, üreaz, karbonik anhidraz, lizozim, glukoz-6 fosfat dehidrogenaz enzim olarak kullanılabilir.

iii. Substrat

Subsrat, enzimle reaksiyona giren ve böylece renk değişikliğine uğrayan maddedir. Kullanılan enzime bağlı olarak kullanılan substrat, floresan, radyoaktif, kemilüminesans, kromojenik karakterli olabilir. Substrat enzime spesifiktir. Öncelikle substrattan ölçülebilir ve çözünür bir reaksiyon ürünü oluşmalıdır. Bu ürün renkli olup gözle ya da spektrofotometre ile tespit edilebilir. En yaygın kullanılan substratlar O-fenilendiamin (OPD), 5-aminosalisilik asit, Azido-benzo-thiazolidin-sülfat (ABTS), 3-3', 5-5' Tetrametilbenzidin (TMB), alfa-naftol ve toluidin'dir.

Elisa Protokolleri	Kullanımları	Gerekli Kimyasallar	Yorumlar
İndirekt	Antikor aramada	Antijen saf veya yarı saf:antikor içeren test solüsyonu;immunize örneklerde ıgG yi bağlayan enzim konjugatı	Önceden varolan spesifik antikorların kullanımına gerek duyulmaz; relatif olarak fazla miktarda antijen gerektirir.
Direkt Kompetitif	Antijen aramada; çözünür antijeni saptama	Antijen saf veya yarı saf; antijen içeren test solüsyonu; spesifik antijen için enzim-antikor konjugatı	Sadece iki basamaktan oluşan bu hızlı test; antijenik çapraz reaksiyonu ölçmede çok başarılı
Antikor Sandviç Yöntemi	Antijen aramada; çözünür antijeni saptamada	Antikor yakalama(capture) (saf veya yarı spesifik antikor); antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	En hassas antijen testi; relatif olarak fazla miktarda saf veya yarı saf antikor gerektirir.
Çift Antikor Sandviç Yöntemi	Antikor arama	Antikor yakalama(capture) (immunize örneklerde ıg için spesifik); antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	Saflaştırılmış antijen gerektirmez; beş basamaklı relatif olarak uzun bir testtir.
Direkt Hücresel Yöntem	Antijen eksprese eden hücrelerinaranmasında;hücresel antijen ekspresyonunun ölçülmesi	İlgili antijeni eksprese eden hücreler; hücresel antijeniçin spesifik enzim-antikor konjugatı	Fazla miktarda taramalarda hassas bir testtir. heterojen hücre gruplarında hassas değildir.
İndirekt Hücresel Yöntem	Hücresel antijenlere karşı oluşan antikorların aranmasında	İmmunizasyonda kullanılan hücreler, antikor içeren test solüsyonları; immünize örneklerde Ig bağlayan enzim konjugatı	Düşük miktarda eksprese edilen hücresel antijenler için spesifik antikorları saptamayabilir.

Tablo 5: Elisa protokolleri

ELISA Protokolleri

Antijen ve antikor bağlanması özgül olduğu için örnekte aranılan antijen ya da antikorların varlığı, miktarı ve cinsi kendileri için özgül olan antijen ya da antikorlar kullanılarak saptanabilir. Değişik şekilde tanımlanan ELISA yöntemleri bulunmaktadır.

Direkt ELISA

Direkt ELISA non kompetatif yöntemin en basit formudur. Antijen katı faza pasif absobsiyon ile bağlandıktan sonra enzimle işaretli antikor eklenir. Bağlı olan ve olmayan reaktifler birbirinden yıkama işlemi ile fiziksel olarak ayrılmaktadır. Yıkama safhasının ardından substrat eklenerek renk değişimi izlenir. Bu yöntem öçülecek her antijen için enzimle işaretli spesifik antikor gerektirir. Bu da birçok farklı antijenin saptanması gereken durumlarda sorun oluşturur.

İndirekt ELISA

İndirekt yöntem antikor saptanmasında ve ölçümünde kullanılan en basit yöntemdir. En önemli avantajı direkt yöntemde olduğu gibi her antijen için enzimle işaretli spesifik antikor gerektirmemesidir. Tek bir işaretli antiglobulin ile çok sayıda farklı antijen test edilebilir. İndirekt yöntemden insan ve hayvan infeksiyonlarında, antikor ölçümünde geniş anlamda yararlanılmaktadır. İndirekt yöntemde antijen aramaya yönelik testlerde çeşitli modifikasyonlar vardır.

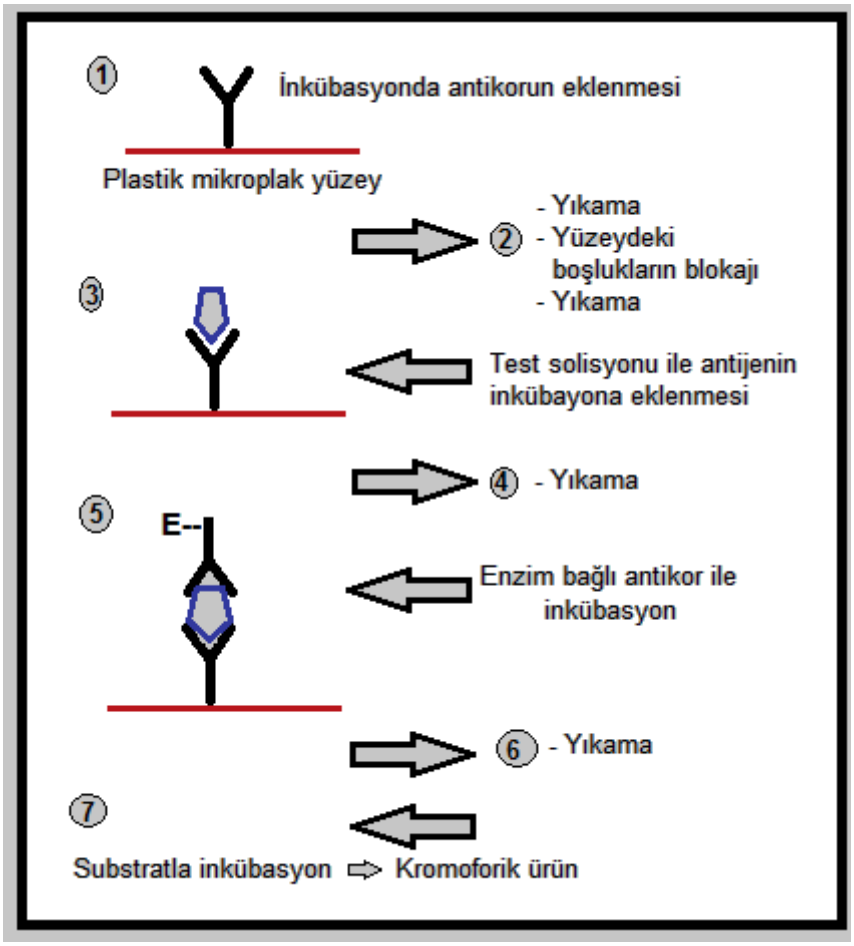
i. Sandviç Yöntem

ELISA yöntemlerinden en çok kullanılan sandviç yöntemidir. Katı faz antijene karşı oluşmuş antikor ile kaplanır. İncelenecek örnek eklenir. İnkübasyon sırasında örnekte, katı fazdaki antikora spesifik antijen varsa solid

faza bağlanır ve yıkanır. Daha sonra antijene spesifik antikorlar eklenir. Serbest antikorlar yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra 2. antikorun hazırlandığı türe spesifik enzimle işaretli antikorlar eklenir. Son olarak enzim substratı eklenerek renk değişimi izlenir. Oluşan rengin şiddeti antijen miktarı ile doğru orantılıdır.

ii. Kompetitif ELISA

ELISA testinde, antijen varlığını gösterebilmek için aranan antijene özgül antikor katı faza bağlanmıştır. Enzimle işaretli antijen ve antijen içerdiği düşünülen klinik örnek katı faza bağlı antikora aynı anda eklenir ve her iki antijenin antikordaki bağlanma bölgeleri için yarışması amacıyla inkübe edilir. Eğer enzimle işaretli antijen katı fazdaki antikora bağlanmışsa yıkama işleminden sonra eklenen substrat hizdrolize olarak renk değişikliğine yol açar. Ancak klinik örnekte aranılan antijen mevcutsa katı fazdaki özgül antikora bu antijen bağlanacağından pozitif sonuç renk değişikliğinin olmaması ile ortaya çıkar. Bu tip yöntemler yüksek konsantrasyondaki antijenlerin ölçümünde ve ayrıca antikorlar için tek bir bağlanma bölgesi bulunan hormonların tespitinde kullanılır. Kolay, hızlı ve inkübasyon sayısı azalmış bir testtir. Nonkompetatif yöntem ile kıyaslandığında, kompetatif yöntem daha spesifiktir.



Şekil 19: Elisa protokol örneği

Çalışmaya başlamadan önce -40 ^{0}C de saklanan örnekler oda ısısına gelene kadar bekletilmiştir. Karşılaştırmalı ADMA ELİSA mikrotiter plate formatını kullanır. ADMA mikrotiter platin solit fazına bağlıdır.Örneklerdeki ADMA Acylation Reagent kullanılarak Acyle hale getirilimiştir. Solit faz bağlı ADMA ile yarışmaya katılır.Fare Anti-ADMA Anti-serum bağlayan alanların fixe edilmesi için Solit faz bağlı ADMA ile yarışmaya katılır. Sistem dengeye ulaştığında serbest antijen ve serbest antijen antiserum kompleksleri yıkma prosesleri ile uzaklaştırılmıştır.Solit faz ADMA ya bağlı antibody antirabbit-peroksidaz ile tespit edilmiştir. Substrat TMB /peroksidaz reaksiyonu 450 nm de okunmuştur. Solit faz ADMA ya bağlı antibody miktarı örneğin ADMA konsantrasyonu ile orantılıdır.Örnekteki ADMA konsantrasyonunun tespiti için, hazırlanmış “kalibrasyon eğrisi” kullanılmış olup sonuçlar litrede mikromol (µmol/L) olarak ifade edilmiştir.

3.4 HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

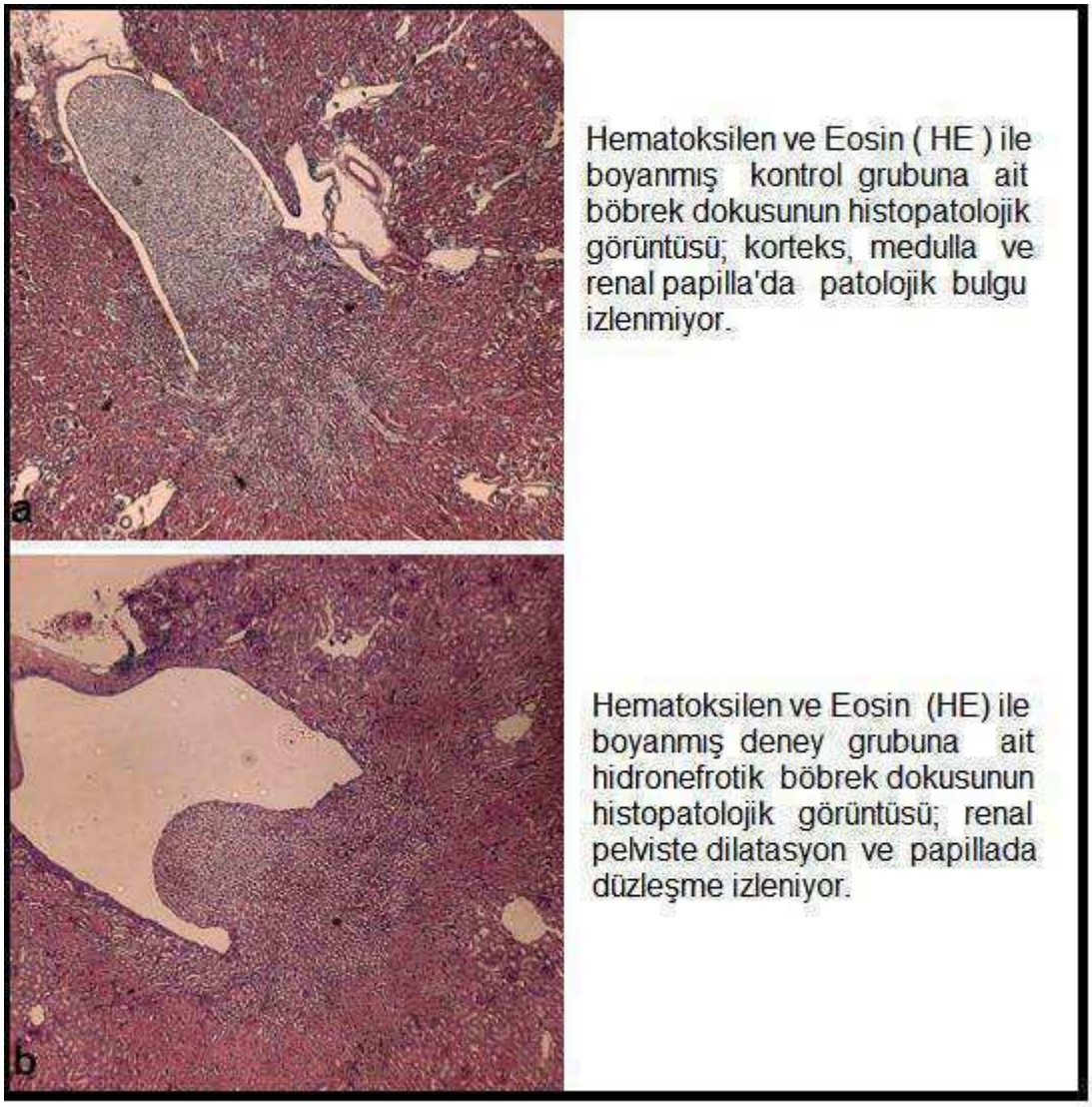
Doku örnekleri serum fizyolojik ile temizlendikten sonra hemen %10'luk tamponlanmış formaldehit içerisinde oda ısısında 72 saat süreyle tespit edilerek rutin ışık mikroskopisinde incelenmek üzere hazırlandılar. Yükselen alkol derecelerinde dehidrate edilen ve xylene ile temizlenen dokular parafine gömüldüler.

Dokulardan 5 mikrometrelik kesitler alındı .Dokular hematoksilen-eozin (H&E) ve periodik acit-Schiff (PAS) ile boyandıktan sonra kesitler ışık mikroskobunda incelenerek fotoğraflandırıldılar.

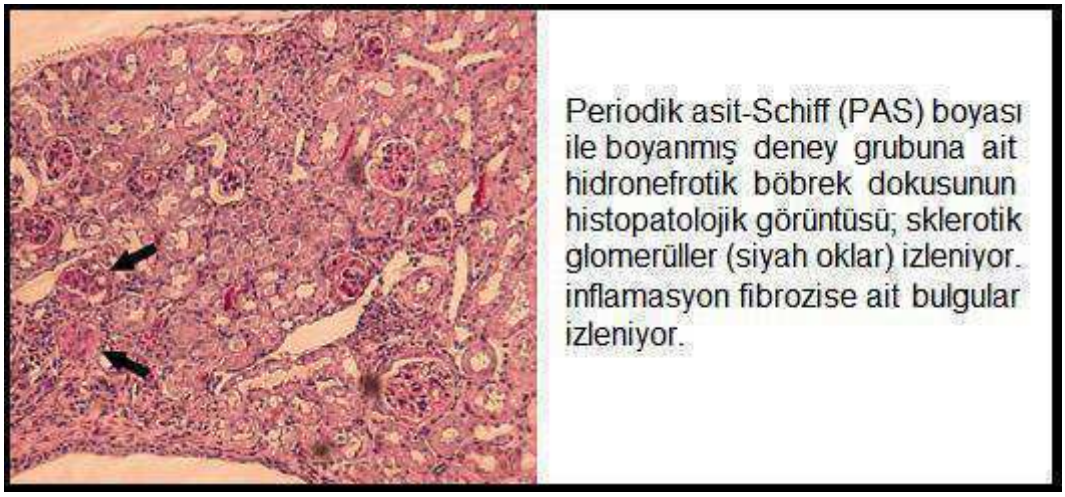
Periodik asit-Schiff (PAS) boyası: Glomerül, tübül bazal membranlarını ve mezengial matriksi gösterir. Proksimal tübüllerin fırçamsı kenarı, Tomm Horsfall proteinleri ve tübülüslerdeki protein damlacıkları veya hyalin materyallerde pozitif boyanır. PAS boyası ile sklerotik glomerül, tübüler atrofi, interstisyel fibrozis değerlendirilebilir.

Tüm kesitler korteks ve medulladaki proksimal ve distal tubulusların dilatasyonu, tubuluslardaki tirodizasyon, interstisyel bağ dokusu artışı ve glomerül kaybı açısından incelenerek karşılaştırıldılar.

Hidronefrotik böbreklerde renal papillalarda düzleşme ve renal pelvisin genişlemesi değişken derecelerde görülebilir. Fibrozis, enflamasyon ve glomerülerdeki değişikliler hidronefrozlar ile ilişkili histopatolojik bulgulardır. Hidronefrotik böbrekte görülen bu değişiklikler Parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon (PUÜO) modeli yapılmış olan ratlara ait böbreklerde gözlendi (Şekil 19 a-b).



Şekil 20 a ve b: Kontrol ve deney grubuna ait böbrek dokusunun H&E boyasıyla mikroskopik görüntüsü (400 µm)



Şekil 21 : Deney grubuna ait böbrek dokusunun PAS boyasıyla mikroskopik görüntüsü (400 µm)

4- BULGULAR

Kullanılan istatiksel yöntem: Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Npar-tests ve Mann- Whitney U testine göre değerlendirildi.

Oksidan stres artışına bağlı olarak, primer antioksidan özellikteki enzim olan (SOD) değerleri 3 gruptada incelendi ve dokuda ölçülen SOD değerlerinin Parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon (PUÜO) oluşturulan deney grubunda sham ve kontrol gurbuna göre anlamlı yüksek olduğu tespit edilmiştir (p=0.001). Buda artmış oksidadif strese yanıt olarak ortaya çıkmıştır.

	Ortalama	**Standart sapma**	**Median değer**
Kontrol	148.82	±3.5	148.3
Sham	152.28	±3.9	151
Deney	162.27	±4.5	164.2

Tablo 6 : Gruplara göre dokuda ölçülen SOD değerleri (µmol/L)

Dokuda ölçülen SOD değerlerinin 3 grupta yapılan ikili karşılaştırmalarında ;

Deney grubu ile kontrol grubu arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulundu (P=0.001).

Deney grubu ile sham grubu arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulundu (P=0.003).

	Ortalama değer	Standart sapma	Median değer
Deney	2,7	±0.59	2,46
Sham	0,92	±0,82	0,9
Kontrol	0,82	±0,14	0,84

Tablo 7: Gruplara göre kan örneklerinde ölçülen ADMA değerleri (µmol/L)

Kanda ölçülen ADMA değerlerinin 3 grupta yapılan ikili karşılaştırmalarında ;
Deney grubu ile kontrol grubu arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulundu (P=0.001).
Deney grubu ile sham grubu arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulundu (P=0.001).

Bu sonuçlar; ADMA değerlerinin Parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon (PUÜO) oluşturulan deney grubunda sham ve kontrol gurbuna göre anlamlı yüksek olduğu tespit edilmiştir (p: 0,001). Sham grubunda kontrol grubundan daha yüksek miktarda ADMA düzeylerine rastlanmıştır. Buda bıze oksidatif stres yaratan cerrahi işlemlerinde ADMA düzeylerini yükseltebileceğini göstermektedir.

NO son ürünü olarak tespit edilebilen nitrit /nitrat düzeyleri hem böbrek dokusunda hem de plazmada saptandı.

	Ortalama	Standart sapma	Median değer
Kontrol	0.45	±0.04	0.44
Sham	0.33	±0.06	0.35
Deney	0.28	±0.02	0.28

Tablo 8 : Gruplara göre dokuda ölçülen nitrit/nitrat değerleri (µmol/g)

Dokuda ölçülen nitrit/nitrat değerleri, Parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon (PUÜO) oluşturulan deney grubunda sham ve kontrol gurbuna göre anlamlı düşük olduğu tespit edilmiştir (p=0.0003).

	Ortalama	**Standart sapma**	**Median değer**
Kontrol	31.72	±2.36	31.02
Sham	21.28	±3.16	21.64
Deney	16.86	±0.57	16.69

Tablo 9 : Gruplara göre plazmada ölçülen nitrit/nitrat değerleri (µmol/L)

Bu sonuçlara göre dokudaki NO son ürünü olan tuzlar deney grubunda ve sham grubuda kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük bulunmuştur (p= 0.0003). Bu düşüklüğün sorumlusu, ortamda bulunan eNOS inhibisyonu olduğu düşünülmektedir.

Plazma nitrit /nitrat düzeyleri tayini sonucu olarak elde ettiğimiz veriler tabloda verilmiştir. Bu sonuçlarda plazma değerleri en düşük deney grubunda saptanmış daha sonra sham grubu ve en yüksek değer kontrol grubunda olmuştur ve tüm grublar arası fark bulunmuştur (p= 0.0003).

Biokimyasal sonuçların 3 gruba ait sonuçları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

	Kontrol		**Sham**		**Deney**		**p**
	ORT	**SS**	**ORT**	**SS**	**ORT**	**SS**	
Doku nitrat	0,45	0,04	0,33	0,06	0,28	0,02	0,0003
Plazma nitrat	31,72	2,36	21,28	3,16	16,86	0,57	0,0003
SOD	148.82	3,5	152,28	3,9	162,27	4,5	0,001
ADMA	0,82	0,14	0,92	0,82	2,7	0,59	0,001

Tablo 10: Verilerin toplu gösterimi

5- TARTIŞMA- SONUÇ

Üriner traktın herhangi bir kesiminde intraluminal veya ekstraluminal nedenlerle idrar akışı engellendiğinde obstrüktif üropati (OU) tablosu ortaya çıkar. Obstrüksiyon sonucu üriner sistemin proksimalinde biriken idrar intraluminal basıncı artırarak renal pelvis, kaliksler ve üreterin etkilenmiş bölgesini dilate eder. Bu değişiklikler nedeniyle üriner sitemde yapısal ve fonksiyonel bozukluklar oluşur buna da obstruktif nefropati denir (167,168).

Obstruktif nefropatiye bağlı renal hasara uğramış olan böbreklerde renal papillalarda düzleşme ve renal pelvisin genişlemesi değişken derecelerde görülebilir. Fibrozis, enflamasyon ve glomerülerdeki değişiklikler, hidronefroz ile ilişkili histopatolojik bulgulardır. Claesson ve arkadaşları yenidoğan ratlarda sol kronik parsiyel üreter obstrüksiyonu yapmışlardır. Histolojik değişikliklerin üreter obstruksiyonundan iki hafta sonra başladığını görmüşler ve öncelikle papilla deformasyonunun değişmez bir bulgu olarak ortaya çıktığını bildirmişlerdir(171). Çalışmamızda böbrekde parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon (PUÜO) modeli oluşturulmuş ve 12 hafta sonra sakrifiye edilmiştir. Hidronefrotik böbrekte histopatolojik değişiklik olarak renal pelviste dilatasyon, papillarda düzleşme, sklerotik glomerüller ve fibrozis izlenmiştir.

Obstrüksiyon nedeni ile birçok vazoaktif faktör ve sitokinlerin etkisi ile glomerüler ve özellikle interstisyel alanlarda patolojik değişiklikler ortaya çıkar. Obstruktif nefropati geliştikten sonra renal hasar oluşumunda ortamda serbest oksijen radikallerinin birikimi, lökosit infiltrasyonu, prostaglandinler (PG), angiotensin (ANG) II, büyüme faktörleri ve nitrik oksit (NO) gibi faktörlerin rolü olduğu bildirilmiştir (169,170). Reaktif oksijen türlerinin (ROT) iskemik, toksik, immunolojik kaynaklı böbrek harabiyetinde rol oynadığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (76,81). ROT' ları prostoglandin, tromboksan, trombosit aktivite edici faktör gibi vazokonstriktör bioaktif lipitleri serbestleştirerek ve

vazodilatör olan nitrik oksiti inaktive ederek glomerül kan akımının ve glomerül filtrasyon hızının düşmesini indüklerler (86,96). Proksimal, distal ve toplayıcı segmentlerdeki böbrek tübüler hücrelerinin ROT' ları üretebildikleri bildirilmiştir (85,86,88,91,92).

ROT'un böbrek hasarındaki rolü glomerülonefrit, nefrotik sendrom, akut böbrek yetmezligi, transplantasyon, toksik hasar, enfeksiyon, obstrüktif nefropati ve kronik böbrek yetmezligi gibi patolojiler deneysel modellerle invivo hayvan deneyleriyle gösterilmiştir (84,88,95). Renal antioksidan enzimlerin postnatal gelişim gösterdiği, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzimlerinin jukstamedüller bölge ve kortikal nefronlarda olduğu immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (97). Bununla birlikte antioksidan enzimlerin aktivitesi biyolojik uyarıyla böbrek hücreleri ve diğer birçok hücrede artmaktadır (98). Örneğin iskemi öncesi ve reperfüzyon sırasında SOD infüzyonunun böbrek hasarını azalttığı görülmüştür (99). Hidrojen peroksit detoksifikasyonunda önemli bir yere sahip olan katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile yapılan çalışmalarda bu enzimlerin inhibe edilmesinin iskemik renal hasarı arttırdığı gösterilmiştir (100).

Ricardo ve arkadaşları ratlarda tek taraflı üreteral obstrüksiyon modeli sonrası reaktif oksijen türleri ve tübüler kaynaklı düzensiz antioksidan enzimlerinin aşırı üretimi nedeniyle artan intrarenal oksidatif stresin, fibrogeneze yol açtığını, fibrojenik sitokinlerin aşırı ekspresyonu ile tübüllerde şekil kaybının ortaya çıktığını bildirmişlerdir (179). Kawada ve arkadaşları unilateral üreter obstrüksiyonu (UÜO) sonrası immünohistokimyal olarak antikorlarda oksidatif stresin bir göstergesi olan N-carboksimetil-lizin(CML) ve Heme osijenaz-1 (HO-1) düzeylerini periglomerular ve peritübüler interstisyumda gözlemlemişlerdir. Artan oksidatif stres ve buna bağlı interstisyumda çeşitli biyolojik aktif oksidatif ürünlerin oluşmasının obstruktif nefropati patogenezinde önemli rol oynadığını göstermişlerdir (180). Kinter ve arkadaşları UÜO modelinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerinden koruyacak olan antioksidan enzimlerini

(katalaz, SOD, glutatyon peroksidaz) yüksek saptamışladır. UÜO sonrası ROS üretimi antioksidan enzimlerin koruyucu kapasitesinden daha büyük olduğunda renal hasar artmakta ve tübüllerde atrofi, interstisyel fibrozis görülmektedir (181).

Bizim çalışmamızda da oksidatif stresin bir göstergesi olan, dokuda ölçülen SOD değerlerinin 3 grupta yapılan ikili karşılaştırmalarında; deney grubunda sham ve kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı derecede yükseklik bulunmuştur. (P = 0.001 ve P=0.003 ; ardışık olarak).

NO'nun böbrek fizyolojisi ve patolojisinde önemli rolleri olduğu ortaya çıkarılmıştır. NO'nun mitokondrial solunum, membran transportu ve hücresel enerji basamaklarında görevli olduğu, glomerüler hemodinamiğin düzenlenmesi, tubuler transport ve tubuloglomerüler geri emilimde rol oynadığı bildirilmiştir (120). Cherla ve Jaimes (173) NO prekürsörü olan arjinin verilmesi sonucu sentezlenen NO'nun böbrek hasarına karsı koruyucu etkileri olduğunu bu etkisini renal hemodinamiği düzenleme, böbrek dokusunda makrofaj infiltrasyonunu azaltma, inflamatuar hasardan koruma ve böbrek dokusunda doku onarımına katkı sağladığını göstermişlerdir. Renal hemodinamiğin düzenlenmesinde arjinin/NO yolunun önemli olduğu, böbrek hastalıklarında oral arjinin kullanılmasının deney hayvanlarında çeşitli yararlı ve zararlı etkilerinin olduğu bildirmişlerdir. Böbrek NO miktarlarında meydana gelen azalmaların renal hasarın ilerlemesinde önemli etkilerinin olduğu, NOS inhibisyonunun ise hipertansiyon ve sodyum retansiyonuna yol açtığı bildirilmektedir (120).

Bir seri çalışma unilateral üreteral obstrüksiyon (UÜO) a hemodinamik yanıtta NO in rolünü incelemiştir. Ratlarda bir NOS inhibitörü olan N^{W}-monometil-L-Arginin (L-NMMA) nin UÜO dan 24 saat sonraki infüzyonu renal kan akımının düşmesine ve renal vasküler rezistansın total vasküler rezistansa

oranının artmasına yol açmıştır(126). Lanzone ve arkadaşları, UÜO öncesi L-NMMA uygulamasının renal kan akımındaki ilk yükselmeyi azalttığını gösterdiler(127). L-NMMA infizyonu kesildiğinde, renal kan akımındaki yükselme 10 dakika içinde düzelmiş. Bu bulgular, üreteral oklüzyon sonrası preglomeruar vasküler direnci düşürmede NO'in rolü olduğunu kanıtlamaktadır. Bu çalışma bize renal fizyolojide NO'in ne kadar etkin bir molekül olduğunu ve üretiminin inhibe edilmesiyle fizyopatolojik etkilerin ortaya çıktığını göstermektedir. Bir başka çalışmada böbrekte eNOS tan oluşan NO, unilateral üreter obstruksiyonuna cevap olarak gelişen renal fibrozise karşı korunmada temel rol oynadığı bildirilmiştir(172). NO'nun biyolojik etkilerinin azalmasıda sonuçta oksidatif strese götürür (182).

Bizim çalışmamızda NO' nun parçalanma ürünü olan nitrit ve nitrata doku ve plazmada bakılmıştır. Bu düzeyler ile ortamdaki NO düzeylerini dolaylı olarak saptamış olduk. Nitrit/nitrat doku ve plazma düzeyleri deney grubunda kontrol ve shama göre istatiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. ($P = 0.0003$ ve $P=0.0003$; ardışık olarak).

ADMA'nın plazma klirensi konusundaki bilgilerimiz gün geçtikçe artıyorsa da, bazı yazarlar, artmış ADMA düzeyininde böbreğin ekskresyon fonksiyonu kaybının sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir.(164,178). Böbrekler, plazmadaki ADMA'nın fizyolojik kontrolünün odak noktasıdır. Çünkü artmış ADMA düzeyinin renal yetmezlikle ilişkili olduğu daha önceki araştırmalarda belirtilmiştir.(155-158). Yüksek konsantrasyondaki ADMA, NOS inhibisyonunun yanı sıra L-Arjininin hücre içine transportunu engelleyerek de NO sentezini azaltır(116). NO'nun yarılanma ömrü oksidatif stres altında azalmaktadır. NO süperoksit anyonlarıyla birleşmekte, peroksinitrit meydana gelmekte ve meydana gelen bu ürün lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır (188,189). ADMA, NOS aktivitesini inhibe ettiğinden NO düzeylerinde bir azalmaya yol açmakta, bunun sonucu olarak da endotel fonksiyon bozuklukları gelişmektedir. Lin ve arkadaşları,

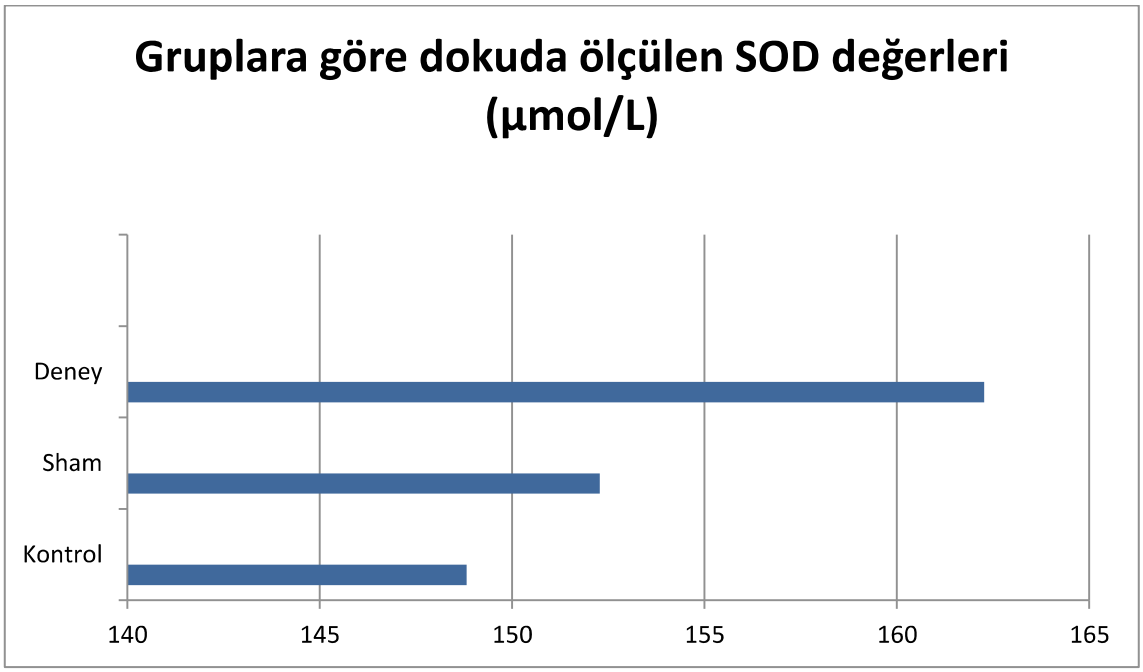
endotel disfonksiyonunda artmış ADMA konsantrasyonunun, plazmadaki ROS'nin üretiminde artışla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (190). Ayrıca Takiuchi ve arkadaşları, koroner ve periferik damar hastalıklarındaki endotel disfonksiyonunun artmış plazma ADMA konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermişlerdir (191).

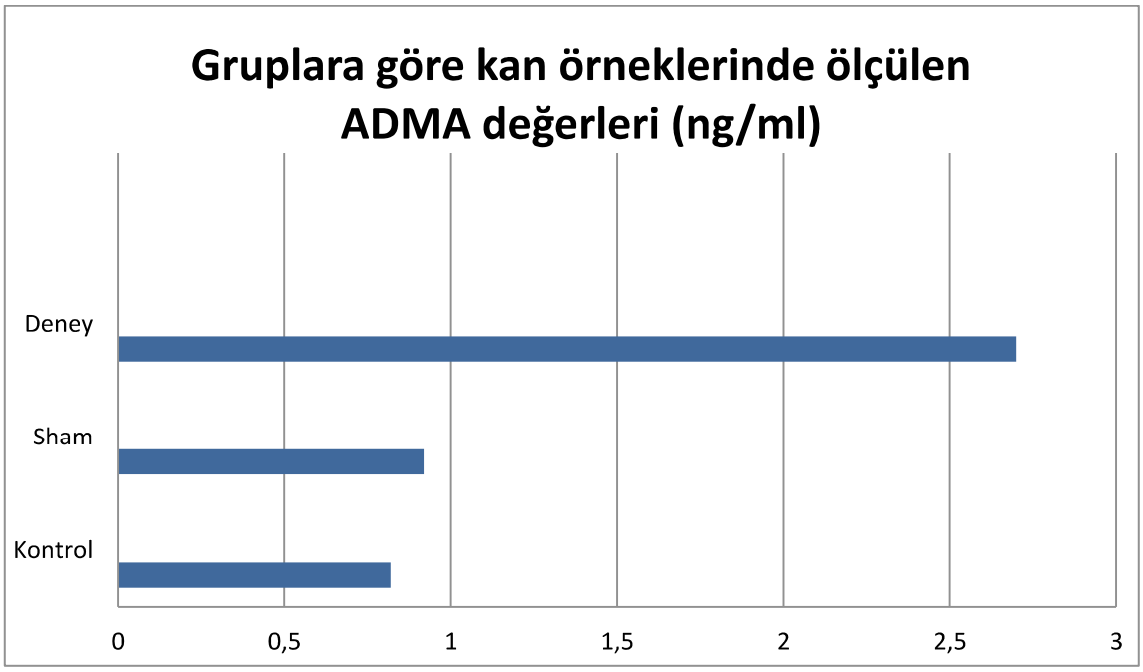
Hiperkolesterolemi, insülin rezistansı, diabetes mellitus, hipertansiyon ve kronik böbrek hastalığı bulunan kişilerin serum ADMA düzeyinde artış vardır (174,175). Bu durumlar dimetil amino hidrolaz (DDAH) enzim aktivitesini bozan vasküler oksidatif stres durumları ile ilişkilidir (176). Endotelyal disfonksiyon genel olarak endojenik vazodilatatör olan nitrik oksitin (NO) üretiminin bozulmasıyla karakterizedir. Endotelyumda, nitrik oksit, nitrik oksit sentazın endotelyal izoformu (eNOS) aracılığı ile L-arjininden üretilir. İnsanlarda, NO sentezi, asimetrik dimetilarjinin (ADMA) ile bozulabilir, endojenik oluşan bileşik L-arjinini substrat bağlanma yerinden uzaklaştırarak NOS aktivitesini inhibe eder. ADMA'nın infüzyonu endotelyum aracılı vazodilatasyonu bozmaktadır. Artmış ADMA plazma düzeyi sadece endotelyal disfonksiyonla ilişkili değildir, aynı zamanda oksidatif stresin artmasıyla da alakalıdır (177). Böger ve arkadaşları, oksidatif stresin ADMA katabolizmasından sorumlu olan DDAH enziminin aktif bölümünde sistein aminoasitine zarar vererek enzim aktivitesini azalttığını ve böylece ADMA'nın yıkımı azalırken kan düzeyini de yüksek saptamışlardır. (145). Bu nedenle oksidatif stresi arttıran birçok dejeneratif hastalıkta ADMA düzeyi yüksek bulunmaktadır. Yeung ve arkadaşları, jukstarenal abdominal aort anevrizması onarımı sonrası postop renal yetmezliğin sadece suprarenal klempleme ve iskemi ile değil, aynı zamanda, infrarenal ve suprarenal klemplemenin neden olduğu oksidatif stres ve yüksek ADMA düzeyi ile de ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Arjinin / ADMA oranının yüksek tutulması ile böbrek fonksiyonunun korunabilmesi açısından önemli olduğu sonucuna varmışlardır (183). Kronik böbrek yetmezliği (KBY) olan hastalarda oksidatif stres oluşumunun artması iyi bilinmektedir (184,185). Üremiye bağlı oksidatif stres, homosistein ve glikasyon son ürünleri gibi DDAH aktivitesini azaltan

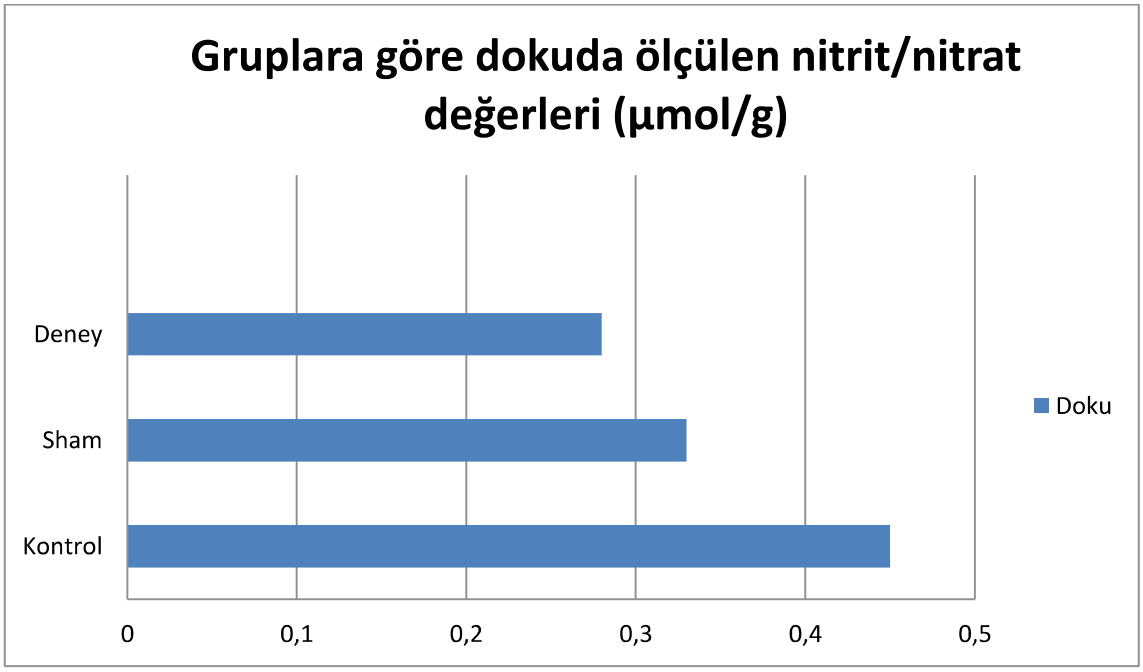
üremik toksinler (186,187), bu enzimin disregülasyonuna yol açarlar. Oksidatif stres, KBY olan hastalarda DDAH disregülasyonuna neden olarak ADMA düzeyini arttırır.

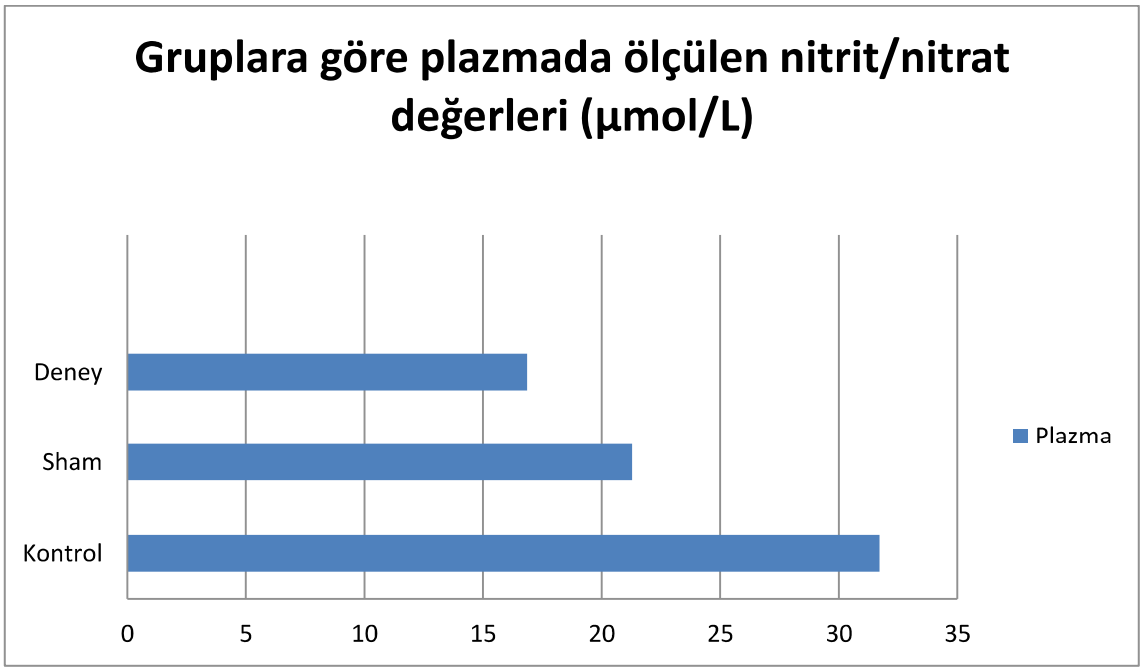
Üreter obstrüsiyonunda da serbest oksijen radikallerinin de arttığı yukarıda da değindiğimiz gibi pek çok çalışmada gösterilmiştir (179,180,181). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bu çalışmalarla uyum göstermektedir. Çalışmamızda deney grubundaki farelerde serbest oksijen radikal (SOR) düzeyi artmış olarak saptanmıştır. Bununla parelel olarak ADMA düzeylerinde de artış olduğunu saptadık. Kanda ölçülen ADMA değerlerinin 3 grupta yapılan ikili karşılaştırmalarında; deney grubunda sham ve kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı derecede yükseklik bulunmuştur. (P = 0.001 ve P=0.001 ; ardışık olarak).

Sonuç olarak; Obstruktif nefropati; idrar akımındaki basit bir mekanik bozukluğun sonucu değil, glomeruler hemodinamik değişiklikler ve üreteral obstruksiyona cevap olarak aktive olan vazoaktif madde sitokinlerin neden olduğu tübüler fonksiyon değişikliğiyle sonuçlanan kompleks bir sendromdur. obtrüktif üropati sonrası görülen renal fonksiyon ve histopatolojik değişikliklerde osidatif stresin ve NO sentezinin bozulması önemli rol oynamaktadır. ADMA, NOS'un endojen bir inhibitörüdür. Çalışmamızda sham ve kontrol grubuna göre parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon modeli oluşturulmuş ratlarda ADMA düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Artmış ADMA düzeyleri NOS üzerinden inhibitör etki göstermek suretiyle böbrekte NO düzeylerinin düşmesine neden olmaktadır. Çalışmamız neticesinde; parsiyel unilateral üreteral obstrüksiyon (PUÜO) modeli ile oluşan oksidatif stresin ADMA yı arttırdığını ve ADMA'nın, böbrek fonksiyon bozukluğu ve böbrek yetmezliği komplikasyonlarında aldığı rol gibi obstruktif nefropati patofizyolojisinde de önemli olduğunu kanıtlamış olduk. ADMA'yı azaltma yolu, obstruktif nefropati sonrası gelişen renal komplikasyonları önlemek için yeni stratejilerde kullanılabilir.


Gruplara göre dokuda ölçülen SOD değerleri (µmol/L)
Deney
Sham
Kontrol
140
145
150
155
160
165


Gruplara göre kan örneklerinde ölçülen ADMA değerleri (ng/ml)
Deney
Sham
Kontrol
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3


Gruplara göre dokuda ölçülen nitrit/nitrat değerleri (µmol/g)
Deney
Sham
Kontrol
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
Doku


Gruplara göre plazmada ölçülen nitrit/nitrat değerleri (µmol/L)
Deney
Sham
Kontrol
0
5
10
15
20
25
30
35
Plazma

KAYNAKLAR

1- Tanagho.E.A.: Anatomy of the genitourinary tract. In Smith's General Urology (17thEdition) Tanagho, 2009,pp:1-30.

2- Mass R, Elfering, S,Glaser,T.,et al: Deficient out-growth of the limbdeformity (ld) mutation. Dev.Dyn.199:214-228,1994.

3- Alcaraz, A., et al.: Obstruction and recanalization of the ureter during embryonic development J.Urol. 145:410,1991.

4- Baker,L.A., Gomez,R.A.: Embryonic development of the ureter : Acquisition of smooth muscle (abstract no.A 1715). J.Am.Soc.Nephrol.7:1593,1996.

5- Matsuna.T.,Tokunaka,S., Koyanagi,T. : Muscular development in the urinary tract.J.Urol.132:148-152,1984.

6- Reddy,P.P. andMandell,J.: Prenatal diagnosis. Urologic Clinics of North America.25 (2) 171-172.1998.

7- Davisson,R.L.,Kim,H.S.,Krege,J.H., et al : Complementation of reduced survival, hypotension and renal abnormalities in angiotensinogen deficient mice by the human renin and human angiotensinogen genes.J.Clin.Invest.99:1258-1264,1997.

8- Cussen,L.J.: Dimensions of the normal ureter in infancy and childhood . Invest.Urol.5:164,1967.

9- Cussen,L.J.: The morphology of congenital dilatation of the ureter: Intrinsic ureteral lesions.Aust N.Z.J.Surg.41:185,1971.

10- Ellis,J.H.Campo,R.P.Marx,M.V.et al: Positional variation in the Whitaker test.Radiology.197:253-255,1995.

11- Maizels,M., Stephens,F.D.: Valves of the ureter as a cause of primary obstruction of the ureter: ANatomic, embryologic and clinical aspects.J.Urol.123:742,1980.

12- Helin I, Persson P.H. : Prenatal diagnosis of urinary tract abnormalities by ultrasound Pediatrics, 78:879-883,1986.

13- Livera, L.N., Brookfield, D.S.K., Eggnitton,J.A., Hawnaur, J.M.: Antenatal ultrasongraphy to detect fetal renal abnormalities: a prospective screening programme. Br. Med. J., 298:1421-1423. 1989.

14- Mandell,J., B., Peters,C.A., Retik, A.B.,Estoff,J.A., Benacerraf,B.R.: Structural genitourinary defects detected inutero, Radiology,178:193-195,1991.

15- Ransley, P.G, Dhillon, H.K., Gordon, I., Duffy,P.G., Dhillon,M.J.,Barrat, T.M. :Postnatal management of hydronephrosis diagnosed by prenatal ultrasound. J.Urol.,(part 2) 144:584 – 587,1990.

16- Koff ,S.A., Campell,K.D.: The nonoperative management of unilateral neonatal hydronephrosis Natural history of poorly functioning kidneys. J.Urol.,(part 2) 152:593 595, 1994.

17- Duckett, J.W.: When the operate on neonatal hydronephrosis. Urology, 42:617- 619,1993.

18- Reznik , V.M., Kaplan, G.W., Murphy,J.L., Packer,M.G.: Follow-up of infants with bilateral renal disease detected in utero. Am.J.Dis.Child.142:453-456,1988.

19- Rickwood AMK : Urinary tract obstruction and dilatation in the newborn. In Lester J and Irving IM (eds) “Neonatal Surgery” , Third edition, London, Butterwoth&Co Ltd, 1990,pp.656.

20- Amar,A.D.: Congenital hydronephrosis of lower segment in duplex kidney.Urology.7:480,1976.

21- Kabalin,J.N.: Surgical anatomy of the retroperitoneum, kidneys, and ureters. InCampbell’s Urology(7’th Edition). Walsh, P.C., Retik,A.B., Vaughan,E.D.Jr., Wein,A.J.(Eds) W.B.Saunders Co.Philedelphia, 1998,pp:69 88

22- Arıncı K, Elhan A. Anatomi; Güneş Kitapevi 1997.

23- Campbell MF, Wein AJ, Kavoussi LR. Campbell-Walsh urology. 9th / ed. Philadelphia, Pa.: Saunders Elsevier; 2007.

24- Tanagho.E.A.: Anatomy of the genitourinary tract. In Smith’s General Urology (17thEdition) Tanagho, 2009,pp:1-30.

25- Hezlinger,D.: Inductive interactions during kidney development. Semin. Nephrol.15:255-262,1995

26- Küpeli S, Küpeli B. Üriner obstrüksiyonlar. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N (Editörler). Temel Üroloji'de. Ankara: Güneş Kitabevi; 1998. s. 270-94.

27- Elder JS, Stansbrey R, Dahms BB, Selzman AA. Renal histological changes secondary to ureteropelvic junction obstruction. J Urol 1995;154(2):719-22.

28- Walsh PC, Retik AB, Vaughan D, Wein A. Konjenital obstrüksiyonun patofizyolojisi (çeviri: Yeşilli Ç, Seçkiner İ). Anafarta MK, Yaman MÖ (Editörler). Campbell Üroloji'de. Ankara: Günes Tıp Kitabevleri; 2005. s.1789-93.

29- Coplen DE, Synder HM. Ureteral Obstruction and Malformations. In: Ashcraft, Murphy, Sharp, Sigalet, Synder. Pediatric Surgery. 12th ed. Philadelphia: W.B. Saunders;2000. p.690-706.

30- Klahr S. Obstructive Nephropathy. Inter Med 2000;39(5):355-61.

31- Mesrobian HG. Urologic Problems of the Neonate: An Update. Clin Perinatol 2007;34(4):667-79.

32- Fernbach SK, Maizels M, Conway JJ. Ultrasound grading of hydronephrosis: introduction to the system used by the Society of Fetal Urology. Pediatr Radiol 1993;23(6):478- 80.

33- Lim DJ, Park JY, Kim JH, Paick SH, Oh SJ, Choi H. Clinical characteristics and outcome of hydronephrosis detected by prenatal ultrasonography. J Korean Med Sci 2003;18(6):859–62.

34- Coplen D. Prenatal intervention for hydronephrosis. J Urol 1997;157(6):2270-7.

35- Yiee J, Wilcox D. Management of fetal hydronephrosis. Pediatr Nephrol 2008;23(3):347-53.

36- Gillenwater JY, Weslervelt FB Jr, Vaughan ED Jr, Howards SS: Renal function after release of chronic unilateral hydronephrosis in man. Kidney Int 1975;7:179-186.

37- Suki WN, Guthrie AG, Martinez-Maldonado M, Eknoyan G: Effects of ureteral pressure elevation on renal hemodynamics; and urine concentration. Am J Physiol 1971:220:38-43.

38- Wilson DR: Pathophysiology of obstructive nephropathy. Kidney Int 1980; 18:281-292.

39- Hanley MJ, Davidson K: Isolated nephron segments from rabbit models of obstructive nephropathy. J Clin Invest 1982;69:165-174.

40- Nielsen S, Kwon T, Christensen B, et al: Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. J Am Soc Nephrol 1999; 10:647-663.

41- Frokiaer J, Christensen BM, Marples D, et al: Downregulation of aquaporin-2 parallels changes in renal water excretion in unilateral ureteral obstruction. Am J Physiol 1997;273:F213-F223.

42- Harris RH, Yarger WE: The pathogenesis of post-obstructive diuresis. The role of circulating natriuretic and diuretic factors, including urea. J Clin Invest ,1975;56 880 887.

43- Harris RH, Yarger WE: Renal function after release of unilateral ureteral obstruction in rats. Am J Physiol 1974;227:806-815.

44- Yarger WE, Griffith LD: Intrarenal hemodynamics following chronic unilateral ureteral obstruction in the dog. Am J Physiol 1974;227:816—826.

45- Hvistendahl JJ, Pedersen TS, Jorgensen HH, et al: Renal hemodynamic response to gradated ureter obstruction in the pig. Nephron 1996;74:168-174.

46- Peters CA. Obstruction of the fetal urinary tract. J Am Soc Nephrol 1997; 8:653 663

47- Matsell DG, Tarantal AF. Experimental models of fetal obstructive nephropathy. Pediatr Neph 2002; 17:470–476

48- Peters CA, Carr MC, Lais A, Retik AB, Mandell J. The response of the fetal kidney to obstruction. J Urol 1992; 148:503–509

49- Matsell DG, Mok A, Tarantal AF.Altered primate glomerular development due to in utero-urinary tract obstruction. Kidney Int 2002; 61:1263–1269

50- MacDonald MS, Emery JL. The late intrauterine and postnatal development of human renal glomeruli. J Anat 1959; 93:331–340

51- Larsson L, Aperia A, Wilton P. Effect of normal development on compensatory renal growth. Kidney Int 1980; 18:29–35

52- Gilbert T, Lelievre-Pegorier M, Malienou R, Meulemans A, Merlet-Benichou C. Effects of prenatal and postnatal exposure to gentamicin on renal differentiation in the rat. Toxicology 1987; 43:301–313

53- Hartman HA, Lai HL, Patterson P. Cessation of renal morphogenesis in mice. Dev Biol 2007; 310:379–387

54- Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. Kidney Int 2009; 75:1145–1152

55- Larsson L, Maunsbach AB. The ultrastructural development of the glomerular filtration barrier in the rat kidney: a morphometric analysis. J Ultrastr Res 1980; 72:392–406

56- Chevalier RL, Kim A, Thornhill BA, Wolstenholme JT. Recovery following relief of unilateral ureteral obstruction in the neonatal rat. Kidney Int 1999; 55:793–807

57- Hilgers KF, Nagaraj SK, Karginova EA, Kazakova IG, Chevalier RL, Carey RM, Pentz ES, GomezRA. Molecular cloning of KS, a novel rat gene expressed exclusively in the kidney. Kidney Int 1998; 54:1444–1454

58- Poucell-Hatton S, Huang M, Bannykh S, Benirschke K, Masliah E. Fetal obstructive uropathy: patterns of renal pathology. Pediatr Dev Pathol 2000; 3:223 231

59- Tarantal AF, Han VKM, Cochrum KC, Mok A, DaSilva M, Matsell DG. Fetal rhesus monkey model of obstructive renal dysplasia. Kidney Int 2001; 59:446–456

60- Chevalier RL, Chung KH, Smith CD, Ficenec M, Gomez RA. Renal apoptosis and clusterin following ureteral obstruction: the role of maturation. J Urol 1996; 156:1474 1479

61- Cachat F, Lange-Sperandio B, Chang AY, Kiley SC, Thornhill BA, Forbes MS, Chevalier RL. Ureteral obstruction in neonatal mice elicits segment-specific tubular cell responses leading to nephron loss. Kidney Int 2003; 63:564–575

62- Thornhill BA, Burt LA, Chen C, Forbes MS, Chevalier RL. Variable chronic partial ureteral obstruction in the neonatal rat: a new model of ureteropelvic junction obstruction. Kidney Int 2005; 67:42–52

63- Chevalier RL, Thornhill BA, Wolstenholme JT, Kim A. Unilateral ureteral obstruction in early development alters renal growth: dependence on the duration of obstruction. J Urol 1999; 161:309–313

64- Snyder HM, Lebowitz RL, Colodny AH, Bauer SB, Retik AB. Ureteropelvic junction obstruction in children. Urol Clin North Am 1980; 7:273–290

65- Valayer J, Adda G. Hydronephrosis due to pelviureteric junction obstruction in infancy. Brit J Urol1982; 54:451–454

66- Josephson S. Experimental obstructive hydronephrosis in newborn rats: III. Long term effects on renal function. J Urol 1983; 129:396–400

67- Chevalier RL, Thornhill BA, Chang AY, Cachat F, Lackey A. Recovery from release of ureteral obstruction in the rat: relationship to nephrogenesis. Kidney Int 2002; 61:2033–2043

68- Sies H. Oxidants and antioxidants. Exp Physiol 1997; 82:291 295

69- Jaques L, Goy J, Rozensztanjn L. et al: Lipid peroxidation and protective enzymes during myocardial infarction. Chim Acta. 1989; 196:119-126.

70- Rice-Evans CA, Diplock AT. Current status of antioxidant therapy. Free Radic Biol Med. 1993;15:77-96

71- SCHULZ JB, LİNDENAU J, SEYFRİED J, DİCHGANS J.(2000) Glutathione, Oxidative Stress and Neurodegeneration. European Journal of Biochemistry; 267: 4904-11

72- Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulator of signal transduction. Free Radic Biol Med 1997; 22:269-285

73- Saugstad O. Neonatal oxygen radical disease. Rec Adv Ped 1992; 6:173-187

74- Halliwel B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Free Rad Res. 1998; 28:672-78.

75- Menache P, Piwnica A. Free radicals and myocardial protection: A surgical viewpoint, Ann Thorac Surgery 1989; 47:939-945

76- Meister A. Glutathione Ascorbate and cell cycle regulation. FEBBS letters. 1994: 1 4.

77- ÇAKMAK A, ZEYREK D, KÜRKÇÜ R, ATAŞ A, ÇİMEN E, OCAK AR, EREL Ö. (2009) Evaluation of Systematic Oxidant and Antioxidant Status in Amateur Adolescent Athletes. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science; 29(2): 367-74

78- Brent JA, Rumack HH. Role of Free Radicals in Toxic Hapatic Injury I. Free Radical Chemistry. J. Clinical Toxicology. 1993; 49(4): 481 493

79- Dizdaro lu M. Mechansms of Oxidative DNA Damage; Lesion and Their Measurement. Kluwer Academic/Plenum Publihers. 1999; 302: 67 87

80- USMAR VD, WİSEMAN H, HALLİWELL B.(1995) Nitric Oxide and Oxygen Radicals: A Question of Balance. Federation of Biochemical Societies; 369: 131-5.

81- DRÖGE W.(2002) Free Radicals ın the Physiological Control of Cell Function. American Physiological Society; 82: 47-95

82- VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVİC M, MAZUR M.(2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact.;160:1-40

83- Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. Front Biosci.1999; 4: 339–345.

84- Waz WR, Feld LG: Reactive oxygen molecules in the kidney. Adv Exp Med Biol 366:171-183, 1994.

85- Baud L, Ardaillou R: Reactive oxygen species: production and role in the kidney. Am J Physiol 251: F765-F776, 1986.

86- Baud L, Ardaillou R: Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. British Med Bulletin 49:621-630,1993.

87- Stratta P, Canavessa C, Dogliani M, Mazzucco G, Manga G, Vercellone A: The role of free radicals in the progression of renal disease. Am J Kid Diseas 17 (Supl.1): 33-37, 1991.

88- Andreoli SP: Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. Pediatri Nefrol 5: 733-742,1991.

89- Rovin BH, Wurst E, Kohan DE: Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture. Kidney Int. 37:1509-1514,1990.

90- Greene EL, Paller MS: Oxygen free radicals in acute renal failure. Miner Electrolyte Metab 17: 124-132, 1991.

91- Andreoli SP, McAteer JA. Reactive oxygen molecule-mediated injury in endothelial and renal tubuler epithelial cells in vitro. Kidney. Int 38: 785-794, 1990.

92- Paller MS, Neumann TV: Reactive oxygen species and renal epithelial

93- Cells during hypoxia and reoxygenation Kidney Int 40:1041-1049,1991.

94- Boyce NW, Tipping PG, Holdswarth SR: Glomerular macrophages produce reactive oxygen species in experimental glomerulonephritis. Kidney Int 35: 778-782, 1989.

95- Shah SV: Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. Kidney Int. 35:1093-1106,1989.

96- Rable H, Khoschsorur G, Colombo T, Petritsch P, Rauchenvald M, Költringer P, Tatzber F, Esterbauer H: A multivitamin infusion prevents lipid preoxidation and improves transplantation performance. Kidney Int. 45: 912-917, 1993.

97- Oberley TD, Oberley LW, Slattery AF, et al. Immunohistochemical localization of antioxidant enzymes in adult syrian hamster tissue and during kidney development. Am J Pathol 1990; 137:199-214

98- Hara T, Miyai H, Iida T et al. Aggrevation of Puromycine aminonucleoside nephrosis by the inibition of endogenous superoxide dismutase. Proc XIth Int Congr Nephrol. 1990, P: 442

99- Jacinto SM, Chintala MS, Lokhandwala MF, Jandhyala BS: Efficacy and mechanisms of dopexamine in the prevention of ischemia-reperfusion induced organ damage: Role of oxygen free radicals. Clin and Exper Hypertension1997; 19:181 190

100- Baud L, Ardaillou R: Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. Br Med J 1993; 49 (3): 621- 629

101- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. Ann Intern Med 1994;120(3):227-37.SUN Y, Oberley LW, Lİ Y 1988

102- Kilbourn RG, Traber DL, Szabo C. Nitrik oxide and shock. Dis Mon 1997;47(5):277- 348.

103- Weight SC, Nicholson ML. Nitric oxide and renal reperfusion injury: A review. Eur J Vasc Endovasc Surg 1998;16(2):98-103.

104- Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. Oral Dis 2001;7(1):2-10.

105- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric oxide: Physology, pathophysology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991;43(2):109-37.

106- Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Ankara: Palme Yayıncılık, 2003:1-50.

107- Southan GJ, Szabó C, Thiemermann C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. Br J Pharmacol 1995;114(2):510-6.

108- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. Foseb J 1992; 6: 3051-3064.

109- Moncado S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmalogy. Pharmacol Rev 1991; 43: 109-142.

110- O' Donnell C, Liew E. Immunological aspects of nitric oxide. The Biochemist 1994; 9-22.

111- Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plazma level of asymmetrical dimethylarjinine in men with essential hypertension. J Cardiovasc Pharmacol 1999; 33: 652-658.

112- Abbasi F, Asagami T, Cooke JP et al. Plazma concenrations of asymmetrical dimethylarjinine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. Am J Cardiol 2001; 88: 1201-1203.

113- Stühlinger M, Abbasi F, Chu JW et al. Relationship between insülin resistance and an endogenous nitric oxid synthase inhibitor. JAMA 2002; 287: 1420-1426.

114- Schraufstater IU, Hinsbaw DB, Hyslop PA, Spragg RG, Cochrane CG: Oxidant injury of cetis. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate –ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. J Clin İnvest 1986; 77: 1312-1320.

115- Anggard E. Nitric oxide: Mediatör, murderer, and medicine. Lancet 1994; 343: 1199-1206.

116- Vallance P, Leiper J.Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. Arterioscler Thromb Vas Biol 2004;24:1023-1030

117- Racic MS, Stadler J, Evans CH. Nitric oxide and arthritis. 56th annual meeting of the ACR, Atlanta, 1992.

118- Gross SS, Levi R: Tetrahydrobyopterin synthesis. An absolute requuirment for cytokine induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. J Biol Chem 1992; 267: 25722-25729.

119- Gabbai FB. Effects of nitric oxide synthase blockers on renal function. Nephrol Dial Transplant 2001;16 Suppl 1:10-3.

120- Klahr S. The role nitric oxide in hypertension and renal disease progression. Nephrol Dial Transplant 2001;16 Suppl 1:60-2.

121- Herrera M, Garvin JL. Recent advances in the regulation of nitric oxide in the kidney. Hypertension 2005;45(6):1062-7.

122- Star RA. Intrarenal localization of nitric oxide synthase isoforms and soluble guanylyl cyclase. Clin Exp Pharmacol Physiol 1997;24:607-10.

123- Morrissey JJ, McCracken R, Kaneto H, Vehaskari M, Montani D, Klahr S Department of Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri. Kidney International [1994, 45(4):998-1005]

124- Akira Miyajima, Jie Chen, Dix P Poppas, E Darracott Vaughan Jr and Diane Felsen Kidney International (2001) 59, 1290–1303

125- D Salvemini, K Seibert, J L Masferrer, T P Misko, M G Currie, J Clin Invest. 1994 May; 93(5): 1940–1947.

126- Chevalier RL, Thornhill BA, Gomez RA Department of Pediatrics, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville. Kidney International [1992, 42(2):400-406]

127- Joseph A. Lanzone, Frederick A. Gulmi*, Shyan-Yih Chou, Unni M.M. Mooppan, Hong Kim The Journal of Urology Volume 153, Issue 6, June 1995, Pages 2055–2059

128- Effects of acute ureteral obstruction on glomerular hemodynamics in rat kidney, Antonio Dal Canton, Rodolfo Stanziale, Ariberto Corradi, Vittorio E Andreucciand Luigi Migone Kidney International (1977) 12, 403–411

129- S. Lamas , T. Michel , B. M. Brenner , P. A. Marsden American Journal of Physiology – Cell PhysiologyPublished 1 October 1991Vol. 261no. C634-C641

130- Clarke S. Protein methylation. Curr Opin Cell Biol 1993; 5: 977–983.

131- McBride AE, Silver PA. State of the Arg: protein methylation at arginine comes of age. Cell 2001;106: 5–8.56

132- Krause CD, Yang ZH, Kim YS,Lee JH, Cook JR, Pestka S. Protein arginine methyltransferases: Evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential.Pharmacol Ther 2006.

133- Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of Sadenosylmethionine- dependent methyltransferases. Circ Res. 2000; 87: 99–105.

134- Lentz SR, Rodionov RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. Atherosclerosis Supplements 2003; 4: 61-65.

135- Yıldırım AO, Bulau P, Zakrzewicz D, Kitowska KE, Weissmann N, Grimminger F, Morty RE, Eickelberg O. Increased Protein Arginine Methylation in Chronic Hypoxia: Role of Protein Arginine Methyltransferases. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006; 35: 436-443.

136- Vallance P, Leiper J. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24: 1023-1030.

137- Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme. NG,Ngdimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. J Biol Chem. 1989; 264: 10205–10209.

138- Kimoto M, Whitley GS, Tsuji H, Ogawa T. Detection of NG, NGdimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody. J Biochem. 1995; 117: 237–238.

139- Cooke JP: Does ADMA cause endothelial dysfunction? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20: 2032-2037.

140- Tran Cam TL, Fox MF, Vallance P, Leiper J. Chromosomal localization, gene structure and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. Genomics 2000; 68: 101–105.

141- Leiper J, MacAllister R, Whitley G, Santa Maria J, Chubb A, Charles I, Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology to microbial arginine deiminases. Biochem J. 1999; 343: 209–214.

142- Arrigoni FI, Vallance P, Haworth SG, Leiper JM. Circulation. 2003; 107: 1195-1201.

143- MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, et al. Regulation ofnitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Br J Pharmacol 1996; 119: 1533–1540.

144- Scalera F; Borlak J; Beckmann B; Martens JL; Thum T; Tager MI; Böger, Stefanie M.Bode.Endogenous Nitric Oxide Synthesis Inhibitor Asymmetric Dimethyl L ArginineAccelerates Endothelial Cell Senescence Arteriosclerosis,Thrombosis andVascular Biology , 2004; 24:1816

145- Böger R, ADMA: a mediator of endothelial dysfunction and marker of vascular disease, Vascular Disease October 2004

146- Fleck C, Schweitzer F, Karge E, Busch M, Stein G: Serum concentration of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. Clin Chim Acta. 336:1-12, 2003.

147- Raconi P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C: Asymmetrical Dimethylarginine Predicts Progression to Dialysis and Death in Patients with Chronic Kidney Disease: A Competing Risks Modeling Approach. J Am Soc Nephrol. 8 : 1-5, 2005.

148- Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Malotino LS, Zoccali C: Prognostic value of combined use of biomarkers of inflammation, endothelial dysfunction, and myocardiopathy in patients with ESRD. Kidney Int. 67 : 2330-7, 2005.

149- Yılmaz MI, Saglam M, Caglar K, Cakır E, Ozgurtas T, Sonmez A, Eyileten T, Yenicesu M, Acikel C, Oguz Y, Ozcan O, Bozlar U, Erbil K, Aslan I, Vural A: Endothelial functions improve with decrease in asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels after renal transplantation. Transplantation. 80: 1660-66, 2005.

150- Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Frolich JC, Haller H, Ritz E, Fliser D. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 170–176.

151- Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, Ogawa T, Vallance P, Wilcox CS: Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. Kidney Int 1997; 52: 1593– 1601.

152- Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Van Guldener C, Stehouwer CD, Rauwerda JA, Teerlink T. Net renal extraction of asymmetrical (ADMA) and symmetrical (SDMA) dimethylarginine in fasting humans. Nephrol Dial Transplant 2002; 17: 1999–2002.

153- Wagner L, Riggleman A, Erdely A, Couser W, Baylis C. Reduced nitric oxide synthase activity in rats with chronic renal disease due to glomerulonephritis. Kidney Int 2002; 62: 532–536.

154- Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 1455–1459.

155- Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, Haller H, and Boger RH. Relationship of asymmetric dimethylarginine to dialysis treatment and atherosclerotic disease. *Kidney Int Suppl* 78: S9–S13, 2001.

156- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, and Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339: 572–575, 1992.

157- Wahbi N, Dalton RN, Turner C, Denton M, Abbs I, and Swaminathan R. Dimethylarginines in chronic renal failure. *J Clin Pathol* 54: 470–473, 2001.

158- Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frolich J, and Boger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 358: 2113–2117, 2001.

159- Kielstein JT, Simmel S, Bode-Boger SM, Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Haller H, and Fliser D. Subpressor dose asymmetric dimethylarginine modulates renal function in humans through nitric oxide synthase inhibition. *Kidney Blood Press Res* 27: 143 147, 2004.

160- Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, Hoeper MM, Haller H, and Fliser D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 109: 172–177, 2004

161- Saran R, Novak JE, Desai A, Abdulhayoglu E, Warren JS, Bustami R, Handelman GJ, Barbato D, Weitzel W, D'Alecy LG, and Rajagopalan S. Impact of vitamin E on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) in chronic kidney disease (CKD): a pilot study. *Nephrol Dial Transplant* 18: 2415–2420, 2003.

162- Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, and Zoccali C. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol* 16: 2449–2455, 2005.

163- Fliser D, Kronenberg F, Kielstein JT, Morath C, Bode-Boger SM, Haller H, and Ritz E. Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: the mild to moderate kidney disease study. *J Am Soc Nephrol* 16: 2456–2461, 2005.

164- Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, and Froelich JC. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 652–658, 1999.

165- Asymmetrical dimethylarginine plasma clearance persists after acute total nephrectomy in rats; Katari A. Carello, Steven E. Whitesall, Mary C. Lloyd, Scott S. Billecke and Louis G. D'Alecy *;Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H209-H216, 2006. First published 19 August 2005;

166- Ulm AH, Miller F (1962) An operation to produce experimental reversible hydronephrosis in dogs. J Urol 88:337

167- Palmieri PA. Obstructive nephropathy: pathophysiology, diagnosis, and collaborative management. Nephrol NursJ 2002;29:15-21.

168- Klahr S. Obstructive nephropathy. Kidney Int 1998;54:286-300.

169- Chevalier RL. Molecular and cellular pathophysiology of obstructive nephropathy. Pediatr Nephrol 1999;13:612-9

170- Çeliker H. Unilateral üreteral obstrüksiyonda octreotidin oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi. [Yan Dal Tezi] Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bölümü; 2002.

171- Boris Chertin, Udo Rolle et al. The role of nitric oxide in reflux nephropathy. Ped. Surgery Int.2002.18:630-634.

172- Saniye EKİNCİ, Arbay O CİFTCİ et al. Ureteropelvic Junction Obstruction Causes Histologic Alterations in Contralateral Kidney. Journal of Pediatric Surgery, Vol 38, No 11,2003.1650-1655

173- Cherla G, Jaimes EA. Role of L-arginine in the pathogenesis and treatment of renal disease. J Nutr 2004;134(10):2801-6.

174- Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? Circulation 2004;109:1813–8.

175- Kielstein JT, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age? Am J Kidney Dis 2005;46:186–202.

176- Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, et al. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Circulation 1999;99:3092–5.

177- ADMA and oxidative stress may relate to the progression of renal disease: rationale and design of the VIVALDI study, Rainer H Böger, Edzard Schwedhelm, Renke Maas, Sabine Quispe-Bravo and Cord Skamira, *Vasc Med* 2005 10: S97

178- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, and Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339: 572–575, 1992.

179- The role of macrophages and reactive oxygen species in experimental hydronephrosis.Ricardo SD, Diamond JR Department of Medicine, Milton S. Hershey Medical Center and the Pennsylvania State University College of Medicine, Hershey, USA. Seminars in Nephrology [1998, 18(6):612-621]

180- Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction Noritaka Kawada, Toshiki Moriyama, Akio Ando, Megumu Fukunaga;Kidney International (1999) 56, 1004–1013.

181- Unilateral ureteral obstruction impairs renal antioxidant enzyme activation during sodium depletion, Michael Kinter, Jennifer T Wolstenholme, Barbara A Thornhill, Elizabeth A Newton, Michael L Mccormick and Robert L Chevalier Kidney International (1999) 55, 1327–1334

182- Araujo M,Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. Curr opin Nephrol Hypertens 2006;15:72-7.

183- İnfrarenal aortic-clamping after renal ischaemia aggravates acute renal failure, Kak K. Yeug, Milan Richir, Paul Hanrath,Tom Teerlink, Eur J Clin İnvest 2011;41(6):605-615

184- Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. Kidney Int. 2002;62:1524-1538.

185- Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Novel cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. J Am Soc Nephrol. 2004;15 Suppl 1:S77-S80.

186- Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. Circulation. 2001;104:2569-2575.

187- Yin QF, Xiong Y. Pravastatin restores DDAH activity and endothelium- dependent relaxation of rat aorta after exposure to glycated protein. J Cardiovasc Pharmacol. 2005;45:525-532.

188- Beckman, J.S., Koppenol, W.H., “Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly”, Am. J. Physiol., 271; 1424-37 (1996).

189- Rubanyi, G.M., Vanhoutte, P.M., “Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor”, Am. J. Physiol., 250; 822-827 (1986).

190- Lin, K.Y., Ito, A., Asagami, T., Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP., “Impaired nitric oxide synhase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase”, Circulation, 106; 987-992 (2002).

191- Takiuchi, S., Fujii, H., Kamide, K., Horio, T., Nakatani, S., Hiuge, A., Rakugi, H., Ogihara, T., Kawano, Y., “Plasma asymmetric dimethylarginine and coronary and peripheral endothelial dysfunction in hypertensive patients”, Am. J. Hypertens., 17 (9); 802-808 (2004).