



T.C
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Üroloji Anabilim Dalı

AKUT TEK TARAFLI ÜRETERAL
TAM OBSTRÜKSİYONA BAĞLI GELİŞEN RENAL HASARIN
TEDAVİSİNDE HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİNİN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI:
RAT MODELİ İLE DENEYSEL ÇALIŞMA

UZMANLIK TEZİ
Dr. Zafer AKAR

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Talha MÜEZZİNOĞLU

MANİSA 2009



T.C
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Üroloji Anabilim Dalı

AKUT TEK TARAFLI ÜRETERAL
TAM OBSTRÜKSİYONA BAĞLI GELİŞEN RENAL HASARIN
TEDAVİSİNDE HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİNİN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI:
RAT MODELİ İLE DENEYSEL ÇALIŞMA

UZMANLIK TEZİ
Dr. Zafer AKAR

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Talha MÜEZZİNOĞLU

Bu tez, 2008-115 kodlu proje olarak Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir.

MANİSA 2009

ÖNSÖZ

Üroloji ihtisasıma başladığım ilk günden itibaren her koşulda bizleri en iyi olma yolunda teşvik eden ve destekleyen, başta değerli anabilim dalı başkanımız hocam sayın Prof. Dr. Coşkun Büyüksu'ya, yalnız üroloji konusunda değil hayata dair kendisinden çok şey öğrendiğim tez danışmanım ve sevgili abim sayın Doç. Dr. Talha Müezzinoğlu'na, hekimliğin yanı sıra insan olmanın da erdemlerini anlatmaktan ve öğretmekten hiç vazgeçmeyen, tecrübelerini sabırla bizlerle paylaşan, tez çalışmalarım süresince değerli katkılarını esirgemeyen değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Murat Lekili'ye, sayın Prof. Dr. Bilal Gümüş'e ve sayın Yrd. Doç. Dr. Gökhan Temeltaş'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Histolojik incelemeleri gerçekleştiren ve çalışmanın her aşamasında desteklerini sunan Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Seda Vatansever'e ve Dr. Mahmut Özkut'a,

Hiperbarik oksijen tedavisini uygulayan ve çalışmada önemli katkısı olan Uzm. Dr. Figen Aydın'a, sağladıkları imkanlar ve verdikleri destek nedeni ile Özel Neoks Hiperbarik Oksijen Merkezi'ne ve değerli personeline,

Birlikte ihtisas yapmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Dr. Yasin Ceylan, Dr. Çağrı Asan, Dr. Meftun Okur, Dr. Oktay Üçer, Dr. Cüneyt Karataş, Dr. Mustafa Yıldırım, Dr. İlker Çelen, Dr. Fatih Zeren, Dr. Mehmet Uyanık, Dr. Erdem Özbek, Dr. Serkan Borazan ve Hemşire Rahime Sevinç başta olmak üzere tüm doktor arkadaşlarıma, klinik ve ameliyathane hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Maddi ve manevi hiçbir şeyi benden esirgemeyen annem ve babama, büyük özveri ve desteği için sevgili kardeşime ve bu günlere gelmemde emeği geçen herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Zafer Akar

İÇİNDEKİLER

Şekiller Ve Tablolar Dizini.....	VI
Kısaltmalar Dizini.....	VII
I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Obstrüktif Nefropati.....	3
2.1.1 Embriyoloji.....	3
2.1.2 Anatomi ve Fizyoloji.....	3
2.1.3 Obstrüktif Nefropati Kliniği.....	8
2.1.4 Tek Taraflı Üreteral Obstrüksiyonda Tübüler Değişiklikler....	10
2.1.5 Tek Taraflı Üreteral Obstrüksiyonda Fizyolojik Değişiklikler....	12
2.1.6 Tek Taraflı Üreteral Obstrüksiyonda Anatomik Değişiklikler..	13
2.1.7 Üst Üriner Sistem Obstrüksiyonunda Patofizyoloji.....	14
2.1.8 Üst Üriner Sistem Obstrüksiyonunda İ/ R Hasarı.....	16
2.2 İskemi / Reperfüzyon Hasarı.....	21
2.2.1 İskemi / Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi.....	24
2.2.1.1. Hücre İçi Kalsiyum Artışı.....	24
2.2.1.2. Serbest Oksijen Radikalleri.....	25
2.2.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nitrik Oksit.....	27
2.2.1.4 Apoptosis Ve Caspase Arkı.....	28
2.2.3. İskemi/ Reperfüzyon Hasarında Hiperbarik Oksijen Tedavisi..	32
2.3. Hiperbarik Oksijen Tedavisi.....	34
2.3.1 Tarihçe.....	34

2.3.2 Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Fizyolojik Temelleri.....	35
2.3.3 Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Endikasyonları.....	37
2.3.4. HBO Tedavisinin Kontrendikasyonları.....	41
2.3.6. HBO Tedavisi Alan Hastalarda Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar.....	41
2.3.7. Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Uygulanması.....	42
III. MATERYAL – METOD.....	43
3.1. Deney Hayvanları.....	43
3.2. Deney Grupları.....	43
3.3. Anestezi.....	45
3.4. Cerrahi İşlem.....	45
3.5. Hiperbarik Oksijen Tedavisi.....	48
3.6. Histolojik Değerlendirme.....	50
3.6.1. Parafin Doku Takibi.....	52
3.6.2. Hematoksilen- Eozin Boyaması.....	53
3.6.3. TUNEL Boyaması.....	54
3.6.4. İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi.....	56
3.7. İstatistiksel Analiz.....	58
IV. BULGULAR.....	59
4.1. Böbrek Dokusu Histokimyasal Sonuçları.....	59
4.2. İmmunohistokimya Sonuçları.....	59
4.2.1. e-NOS Dağılımı.....	60
4.2.2. i-NOS Dağılımı.....	60

4.3. TUNEL Boyama Sonuçları.....	61
4.4. Kaspaz-3 Dağılımı.....	62
4.5. Histolojik Değerlendirme Sonuçları.....	70
V.TARTIŞMA.....	71
VI. SONUÇ.....	82
VII. ÖZET.....	83
VIII. SUMMARY.....	84
IX. KAYNAKLAR.....	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İskemik Dokularda Ksantin Oksidaz Yolu İle Serbest Oksijen
Radikal Üretimi

Şekil 2. Ratların Hazırlanması

Şekil 3. Sol Böbreğin Bulunması, Sol Üreterin Diseksiyonu Ve Bağlanması

Şekil 4. Laparatominin Anatomiye Uygun Kapatılması

Şekil 6. HBO Tedavi Şeması

Şekil 7. HBO Uygulaması

Şekil 8. Çıkarılan Böbrek Dokularının Makroskopik Görünümleri

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Obstrüktif Nefropati Nedenleri

Tablo 2. Sağlık Bakanlığı HBO Endikasyon Listesi

Tablo 3. UHMS Tarafından Belirlenen HBO Endikasyon Listesi

Tablo 4. ECHM'nin Belirlediği HBO Endikasyon Listesi

Tablo 5. Deney Grupları

Tablo 6. Parafin Doku Takibi

Tablo 7. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Tablo 8. TUNEL Boyaması

Tablo 9. İndirek İmmunohistokiya Boyaması

Tablo 10. HSCORE Değerleri

Tablo 11. Böbrek Korteksine Ait Karşılaştırmalı İstatistiksel Sonuçlar

Tablo 12. Böbrek Medullasına Ait Karşılaştırmalı İstatistiksel Sonuçlar

Tablo 13. Hematoksilen –Eozin Boyasına Ait Resimler

Tablo 14. e-NOS Ve i-NOS İmmunoreaktivitesine Ait Resimler

Tablo 15. Kaspaz-3 Dağılımı Ve TUNEL Pozitif Hücrelere Ait Resimler

KISALTMALAR DİZİNİ

ATA	Atmosphere Absolute
ATP	AdenozinTriFosfat
Ang	anjiotensin II
CAM	Hücrel Adezyon Molekülleri
CAT	Katalaz
ÇTÜO	Çift taraflı üreter obstrüksiyonu
DISC	Death-inducible signaling complex
DNA	DeoksiriboNukleikAsit
EDTA	etilendiamintetraasetikasit
FADD	Adaptör protein
FasL	Fas ligandı
GFR	Glomeruler filtration rate
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
GPx	Glutasyon peroksidaz
HBO	Hiperbarik Oksijen
I/R	İskemi/Reperfüzyon
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
Kaspaz	Aspartat-Spesifik Sistein Proteaz
MDA	Malondialdehit
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
OH [·]	Hidroksil Radikali
ONOO ⁻	Toksik Peroksinitrit
PMNL	Polimorfonükleer Lökosit
RKA	Renal Kan Akımı
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikali
SPSS	StatisticalPackageFor Social Sciences
TGF- B	Transforme Edici Büyüme Faktörü-B
TTÜO	Tek Taraflı Üreter Obstrüksiyonu
UHMS	Sualtı Ve Hiperbarik Tıp Birliği

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Obstrüktif üropati, idrar çıkışının engellenmesi, geri kaçması ve buna bağlı oluşabilecek böbrek hasarını tanımlar (1). Tıkanıklık; üriner yolun olmaması, lümen içi basıncın artması, üriner taş ve enfeksiyon sonucu oluşan staz ile meydana gelebilir. Tıkanıklığın tek üreterde ya da her iki üreterde olması tek böbreği ya da her iki böbreği etkileyebilir. Yetişkinde tek taraflı üreter obstrüksiyonunun (TTÜO) en sık nedeni renal taşlardır (1). Üst üriner sistem obstrüksiyonları organ kaybına yol açabilmeleri nedeni ile üroloji pratiğinde önemli bir yere sahiptir. Üriner sistem obstrüksiyonu eğer tedavi edilmez ise renal parankimal hasarın en sık sebebidir (2). Üst üriner sistem obstrüksiyonları, tedavi spektrumu oldukça geniş patolojilerdir. Obstrüksiyonun düzeyi, derecesi ve süresi planlanacak tedavinin belirlenmesine yön vermektedir. Tedavide birincil amaç, obstrüksiyonu gidererek böbreğin fonksiyonel rezervini korumak ve/ veya bir miktar geri kazanmaktır. Ancak ciddi obstrüksiyonun uzun sürmesi halinde böbreğin fonksiyonel rezervi, nefrektomi yapılmadığı takdirde, neden olacağı morbiditeleri göze alamayacak kadar az olabilir.

Hiperbarik Oksijen (HBO) tedavisi, izole bir basınç odasında hastaya deniz seviyesindeki atmosferik basınçtan 2-3 kat daha fazla bir basınçta %100 oksijen solutulması ile uygulanan bir tedavi şeklidir (3).

Günümüzde, yapılan başarılı klinik çalışmalar ışığında HBO; yara iyileşmesinde, CO zehirlenmesinde, nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonlarında kullanılmakta, kemoterapotiklerle kombine edilerek tümör tedavisinde kullanımı ise araştırma aşamasındadır (4-8).

İnterstisyumdaki değişiklikleri hedef alan deneysel stratejilerin TTÜO tedavisine medikal katkı olarak gelecekte rol alacakları düşünülmektedir. Ancak literatürde obstrüksiyon varlığında HBO uygulanmasının böbrekte oluşturabileceği olası etkileri araştıran bir çalışma yoktur.

Ratlarda iyi düzenlenmiş TT O modelleri ile oluşturulan deneysel çalışmalar, insanda TT O'ya bağlı oluşan obstrüktif  ropatiyi iyi düzeyde gösterebilmektedir (9, 10).

Biz de bu çalışmamızda, ratlarda deneysel olarak oluşturulacak TT O'nun böbrekte neden olduğu hasarın tedavisinde ve/veya  nlenmesinde HBO tedavisinin etkinliğini araştırmayı amaçlıyoruz.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. OBSTRÜKTİF NEFROPATİ

Üriner sistemin herhangi bir yerinde idrar akımını engelleyen bir yapının varlığı obstrüktif üropati olarak tanımlanır. Obstrüktif nefropati terimi ise üriner sistemin herhangi bir yerindeki obstrüksiyon nedeniyle oluşan böbrek parankim hasarını tanımlar.

Üriner sistemin herhangi bir yerinde olan direnç artışı obstrüksiyonun proksimalinde volüm ve basınç artışı ile başlayıp renal kan akımında azalma ile devam ederek, hücresel atrofi ve nekrozla sonuçlanır. Oluşan progresif dilatasyon ve böbrek harabiyeti hidronefroza sonuçlanmaktadır (11).

Obstrüktif nefropatiye neden olan durumlar Tablo 1’de özetlenmiştir.

2.1.1. Embriyoloji

Gebeliğin 4. haftasında distal mezonefrik kanaldan gelişen üreter tomurcuğu metanefrik blastem ile etkileşerek dallanır ve kaliksleri, pelvisi ve üreteri oluşturur. Üreter tomurcuğunun distalinde kalan mezonefrik kanal segmentine ana boşaltım kanalı denir. Bu kanal gelişmekte olan mesaneyle birleşerek trigonun bir parçasını oluşturur. Üreter tomurcuğunun başlama noktası üreter orifisidir. Ortak boşaltım kanalı mesaneyle birleştikten sonra üreter orifisleri mesane içinde kranial ve lateral yönde ilerler (12).

2.1.2. Anatomi Ve Fizyoloji

Üst üriner sistem, böbrek kaliksleri, renal pelvis ve üreterleri içerir (13). Böbrekler çift organlar olup, retroperitoneal alanda vertebral kolonun yanlarında, onikinci torakal ve üçüncü lumbal vertebralar seviyesinde bulunurlar. Sağ böbrek, sola oranla bir miktar daha aşağıda bulunur.

Böbreğin uzunluğu 12 cm, genişliği 5 – 7 cm, kalınlığı 3 – 4 cm kadardır. Ağırlığı yetişkin erkeklerde ortalama 150 gr, kadınlarda 125 gr kadardır. Böbreğin ön ve arka olmak üzere iki yüzü, iç ve dış iki kenarı, üst ve alt iki ucu vardır. Yüzlerden her ikisi de konvektir. İç kenarın ortasında hilus renalis denen bir yarık vardır. Buradan böbreğin içinde bulunan ve sinüs renalis denilen boşluğa girilir (14-16).

Böbreğin hilusunu oluşturan bu alanda böbreğe giren ve çıkan damar ve sinirler, renal pelvis ve bunların arasını dolduran yağ dokusu bulunur. Bu oluşumların hilustaki sıralanışı önde renal ven, bunun arkasında renal arter ve en arkada renal pelvis şeklindedir. Lenf damarları renal pelvisin, sinirler ise renal arterin etrafında bulunurlar.

Böbrekler uzun ekseninden ikiye kesilecek olursa dış kısmında korteks, iç kısmında medulla denilen iki ana bölge ayırtdedilir. Böbreğin medullasında böbrek piramidleri denen koni biçimli çok sayıda doku kitleleri bulunur. Piramidlerin tabanı korteks ile medulla sınırından başlar ve üreterin huni biçimli üst ucunun devamından oluşan böbrek pelvisinin devamına doğru uzanan papillada son bulur. Pelvisin dış sınırı majör kaliks denilen açık ceplerle aşağı doğru uzanır ve her papillada tüplerden idrar toplayan minör kalikslere ayrılır. Kalikslerin, pelvisin ve üreterlerin duvarları idrarı mesaneye doğru ilerletebilen kasılabilir elemanları içerir (18). Renal arter hilum bölgesinden böbrek veni ve üreterler ile birlikte böbreğe girer ve interlober, arkuat, interlobuler (radial arter) arterlere ve afferent arteriollere ayrılır. Afferent arterioller, glomerüler kapillerleri oluşturur. Her glomerül kapillerinin distal ucu, böbrek tübüllerini çevreleyen ve peritübüler kapiller denilen ikinci bir kapiller ağı oluşturan efferent arteriyolu oluşturmak için bir araya gelirler. Peritübüler kapillerler arteriyoler damarlara paralel seyreden venöz sistemin damarlarına boşalırlar ve bunlar da sırasıyla interlobüler ven, arkuat ven, interlober ven ve en sonunda böbreği renal artere komşu olarak terkeden böbrek venini oluştururlar (19, 20).

Tablo: 1 Obstrüktif Nefropati Nedenleri (17' den uyarlanmıştır.)

	Renal	Üreter	Mesane - Üretra
Konjenital	Polikistik böbrek Renal kist Peripelvik kist Üreteropelvik bileşkede fibröz obstrüksiyon Üreteropelvik bileşkede aberran damar	Striktür Üreterosele Üreteral valf Ektopik böbrek Retrokaval Üreter Üreterovezikal reflü Prune-belly Sendromu	Posterior üretral valv Fimozis Üretral Striktür Hipospadias Epispadias
Neoplastik	Wilms tümörü Renal hücreli karsinom Multipl myelom 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 Üreteritis sistika Endometriyozis	Prostatit, Paraüretral abse
Metabolik ve Diğer	Taş Travma Papiller nekroz Renal arter anevrizması	Retroperitoneal fibrozis Pelvik lipomatozis Aortik anevrizma Radyoterapi Lenfositel Travma Ürinom Gebelik	Benign prostat hipertrofisi Nörojenik mesane.

İnsanda her böbrek bir milyon kadar nefrondan oluşur. Böbrek hasarı, hastalık veya yaşlanma ile nefron sayısı giderek azalır. 40 yaşından sonra işlev gören nefron sayısı her on yıl için %10 azalır. Her nefronun; kandan büyük miktarda sıvının filtre olduğu glomerül ve filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü toplayıcı tübül olmak üzere iki ana bölümü vardır.

Glomerül, diğer kapiller ağlar ile karşılaştırıldığında, daha yüksek hidrostatik basınca (60 mmHg) sahip, dallanan ve anastomoz yapan kapiller bir ağdan oluşmuştur. Glomerüler kapillerler epitel hücreleri ile örtülmüştür ve tüm glomerüller bowman kapsülü ile sarılmıştır. Glomerüler kapillerden filtre olan sıvı bowman kapsülü içine ve sonra böbrek korteksinde yer alan proksimal tübül içine akar. Sıvı proksimal tübülden böbrek medullasının derinliklerine doğru inen henle kıvrımına akar. Her kıvrımın bir inen bir de çıkan kolu vardır. Çıkan kolun sonunda, duvarında bir plak içeren kısma makula densa denir. Bu kısım nefron fonksiyonunun kontrolünde rol oynar. Sıvı makula densadan distal tübüle ulaşır. Distal tübülü birleştirici (connecting) tübül ve kortikal toplayıcı (collecting) tübül izler. Sıvı buradan kortikal toplayıcı kanala ulaşır. 8-10 adet kortikal toplayıcı kanalın başlangıç kısımları birleşerek, medullada seyreden ve medüller toplayıcı kanal denilen daha geniş bir toplayıcı kanal yaparlar. Toplayıcı kanallar sonunda papillanın tepesi aracılığı ile böbrek pelvisine boşalırlar (18).

Glomerüler filtrasyon, maddelerin böbrek tübüllerinden kana geri emilimi ve kandan maddelerin böbrek tübüllerine sekresyonu işlemleri sonucunda böbreklerin süzme fonksiyonu gerçekleştirilir. İdrar oluşumu, proteinsiz fazla miktarda sıvının glomerüler kapillerden bowman kapsülü içine filtrasyonu ile başlar. Proteinler hariç plazmadaki maddelerin çoğu serbestçe bowman kapsülü içine filtre olduğu için, bowman kapsülü içindeki glomerüler filtratta, bu maddelerin konsantrasyonları plazmadakine eşittir. Filtre olan sıvı bowman kapsülünü terkedip tübüller boyunca ilerlerken içindeki spesifik solütlerin ve suyun geri emilerek kana geçmesi veya başka maddelerin peritübüler kapillerden tübül içine salgılanması nedeniyle değişikliğe uğrar (18, 21, 22).

Glomerüler filtrasyon hızı (GFR); kapiller membrana etki eden kolloid osmotik basınç ve hidrostatik basınç arasındaki denge ile kapillerin filtrasyon yapan yüzey ve geçirgenliğinin ölçütü olan kapiller filtrasyon sabitesi tarafından tayin edilir (21). Normal yetişkin bir insanda GFR 125 ml/dakikadır. Glomerüler kapiller membran; kapiller endoteli, bazal membran ve bazal membranın dış yüzeyini çevreleyen epitelyal hücre (podosit) tabakasından oluşmaktadır. Bu tabakalar birlikte filtrasyon bariyerini oluşturur.

Böbrek kaliksleri intrarenal yerleşimli olup böbrek parankimi ile yakın ilişkidir. Minör kalikslerin sayısı 8 ile 12 arasında değişmektedir. Uç kısımları piramidlerin uzantılarıyla çentiklenmektedir. Minör kaliksler birleşerek böbrek pelvisine boşalan major kaliksleri oluşturmaktadır. Major kalikslerin sayısı 2 ile 3 arasında değişmektedir. Böbrek pelvisi tamamen intrarenal veya kısmen intrarenal kısmen de ekstrarenal olabilmektedir. Böbrek pelvisi alt iç yanda incelererek üreteri oluşturur. Yetişkin üreterinin boyu bireyin boyu ile doğrudan ilişkili olup ortalama 30 cm.dir. Oldukça düzgün bir "S" eğrisi çizerek mesaneye kadar uzanır. Üreter boyunca 3 adet rölatif darlık alanları mevcuttur. Bunlar; üreteropelvik bileşke, üreterin iliak damarları çaprazladığı bölge ve üreterin mesane içine girdiği yerdir. Yukarıdan aşağıya doğru üreterler psoas kasının üstünden sakroiliak eklemlerin iç yanına geçer, dış yanda seyrederek iskiyal çıkıntıların yanından geçer. Daha sonra içyana dönerek mesane tabanından içeriye girer. Kadınlarda uterin arterler jukstavezikal üreter segmenti ile yakın komşuluk gösterirler. Üreterler posterior peritonla örtülüdür. Jukstavezikal kısımları ise retroperitoneal yağ dokusu içindedir. Vaz deferensler inguinal halkayı geçerken üreterlerin ön yüzündeki lateral pelvik duvarları üzerinden seyrederek. Seminal veziküllerle birleşmeden ve prostat tabanını delip ejakülatuar kanalları oluşturmadan önce üreterlerin iç yanında lokalizedirler (23).

Üreterlerin mukozası değişici (tranzisyonel) epitel ve bağ dokusundan oluşan lamina propriadan oluşmaktadır. Kas tabakaları heliks şeklinde düzenlenmiştir. Üreterler mesane duvarına idrarın geri akımını önleyen bir kapak oluşturacak biçimde oblik olarak girerler. Üreterin intravezikal kısmında yalnız longitudinal kas lifleri bulunur. Üreterler dıştan adventisya

membranı ile sarılmışlardır (24).

İdrarın pelviste toplanmasıyla yükselen basınç, pelvisten başlayarak üreter boyunca aşağıya doğru yayılan bir peristaltik dalgayı başlatır. Peristaltik dalga her 2-3 dakikada bir 10 saniye süreyle oluşarak 3 cm/sn kadar hızla yayılır. Peristaltik dalga idrarı 50- 100 mmHg'lik bir dirence karşı hareket ettirebilir. Peristaltik dalganın oluşumunu üreter çeperindeki sinsisyum yapan düz kastan geçen aksiyon potansiyelinin yaratması olasıdır. Parasempatik uyarma dalgaların frekansını arttır, sempatik uyarma ise frekansı azaltır ve bu yolla kontraksiyon şiddetini de kontrol edebilir.

Aşağı uçlarında üreterler oblik olarak trigona girerler. Mesane epiteli altında birkaç santimetre uzanan üreterler mesanedeki basınç altında bulunduklarından, idrarın çıkarılması sırasında bu basıncın yükselmesiyle idrarın geriye akışı önlenir.

Üreterler ağrı liflerinden zengindir. Üreterde taş gibi sebeplerden dolayı obstrüksiyon olduğu zaman, şiddetli kasılmayla beraber ağrı da meydana gelir. Ağrı uyarıları gerideki böbreklerde de sempatik refleks yaratarak böbrek arteriyollerinin daralmasına ve böylece böbrekten idrar akışının azalmasına yol açarlar ki bu etkiye üreterorenal refleks adı verilir (25).

2.1.3 Obstrüktif Nefropati Kliniği

Üriner sistem obstrüksiyonunun klinik tablosu değişkendir. Asemptomatik (tesadüfen saptanan) olgular yanında renal kolik tablosu ile başvuran veya hidronefroza sekonder enfeksiyona bağlı gelişen ateş ile başvuran hastalar bulunmaktadır.

Semptom kompleksi:

- 1) Obstrüksiyonun oluşma süresine (akut ya da kronik),
- 2) Tek taraflı ya da bilateral oluşuna,
- 3) Obstrüksiyonun nedenine (intrensek ya da ekstrensek)
- 4) Komplet ya da parsiyel oluşuna göre değişir.

Akut obstrüksiyon genellikle aynı taraf kasık ya da uyluk ya da her ikisine birden yayılabilen lomber ağrı ile birliktedir. Hastalarda bulantı, kusma ve üşüme sık görülür. Renal ünite enfekte olmuşsa yüksek ateş de mevcut olabilir. Akut tek taraflı üreteral obstrüksiyona, iki taraflı üreteral obstrüksiyondan (İTÜO) daha sık karşılaşılr. Eğer akut iki taraflı obstrüksiyon olursa hastada ani gelişen anüri de görülür. Genellikle asemptomatik olan hastalarda TTÜO ve İTÜO uzun bir zaman periyodunda gelişmiş olabilir. Bunlarda obstrüksiyonun tanısı daha güçtür ve çoğu olguda tesadüfen saptanır. Obstrüksiyon iki taraflı ve kronik olduğunda hastalar karın çapında artma (kemerin dar gelmesi), ayak bileğinde ödem, keyifsizlik, iştahsızlık, baş ağrısı, kilo artışı, bitkinlik ve nefes darlığı gibi nonspesifik semptomlar ile de başvurabilir. Mental durumda değişiklik, tremor ve gastrointestinal kanama gibi üremik semptomları da olabilir. Soliter böbrekli ya da karşı taraf böbreği nonfonksiyone olan hastalar tek taraflı obstrüksiyon ve üremi semptomları ile gelebilir.

Obstrüksiyon iki taraflı ve kronik ise hasta aşırı diürezler esnasında aralıklı lomber ağrıdan yakınabilir (bilinen bir diüretik, alkol alımından sonra olduğu gibi). Hidronefroz künt travma ile birlikte ise, gross hematüri en belirgin semptom olabilir. İster iki taraflı isterse tek taraflı olsun, ekstremsk nedenli obstrüksiyonlar genellikle daha rastlantısal ve dolayısıyla semptomsuzdurlar. Bu obstrüksiyonlar genellikle primer hastalık sürecinin rutin klinik değerlendirmesi esnasında tesadüfen saptanır.

Üriner sistem obstrüksiyonunun klinik belirtileri nonspesifiktir. Fizik muayenede palpe edilebilen abdominal kitle ile başvurabildiği gibi, nadiren iki taraflı alt ekstremitede ödem, pulmoner konjesyon ve hipertansiyon gibi volüm yüklenmesi belirtileri ile de ortaya çıkabilir. Laboratuvar verileri hematüri (mikroskopik ya da makroskopik), proteinüri, kristalüri, piyüri ve idrar silendirlerini içerebilir. Predominant klinik tablo kronik obstrüksiyon ise tanısal idrar göstergeleri genellikle akut tübüler nekrozdakiler gibidir; idrar sodyum konsantrasyonunda yükselme, idrar ozmolalitesinde azalma ve idrar-plazma kreatinin oranında azalma görülebilir. Obstrüksiyon daha akut ve böbrek yetmezliği eşlik etmiyorsa, üriner indeksler prerenal azotemidekileri

andırabilir; düşük idrar sodyum konsantrasyonu ve artmış idrar ozmolalitesi, serum analizlerinde serum kan üre azotu (BUN) ve kreatinin düzeylerinde yükselme, hiperkalemi ve asidoz görülebilir.

Bakteriyel üriner sistem enfeksiyonu varlığında akut obstrüksiyon olursa hastalar piyelonefrit ya da sistemik sepsis semptom ve bulgularıyla gelebilir. Enfeksiyonla birlikte obstrüksiyon gerçek bir ürolojik acil durumdur ve uygun görüntüleme çalışmaları (ekskretuar ürografi, renal ultrasonografi, ya da retrograd üreteropyelografi) mutlaka acil olarak yapılmalıdır. Perkütan nefrostomi ya da bir üreteral stent ile obstrüksiyon mutlaka giderilmelidir.

2.1.4 Tek Taraflı Üreteral Obstrüksiyonda Tübüler Değişiklikler

Gillenwater ve arkadaşları 7'si üreteropelvik bileşke obstrüksiyonuna ve 3'ü üreteral obstrüksiyonuna sekonder toplam 10 TTÜO'lu hastanın verilerini sunmuştur (26). Obstrüksiyonlu böbrekteki fonksiyon obstrüksiyonun giderilmesinden bir hafta sonra değerlendirilmiştir. Obstrüksiyonun şiddeti tüm olgularda, ortadan-ağıra kadar derecelendirilmiştir.

Obstrüksiyonlu böbrekteki GFR (24ml/dak), obstrüksiyonlu olmayan böbrekten (60ml/dak) belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p<0.0002$). Obstrüksiyonun giderilmesinden bir hafta sonra obstrüksiyonlu ve obstrüksiyonlu olmayan böbrek arasında gerçek bir konsantrasyon defektinin mevcut olduğu, ancak, hastaların hiçbirinde postobstrüktif diürez olmadığı görülmüştür. Obstrükte böbreğin, absolu sodyum ekskresyonu daha düşük, ancak fraksiyone sodyum ekskresyonu her iki böbrekte de aynı bulunmuştur. Üreteral obstrüksiyondan sonra proksimal tübüler transportun da bozulduğu saptanmıştır. Ancak bu değer, obstrüksiyondaki GFR düşüşüne uyarlandığında her iki böbrek arasında farklılık görülmemiştir (J 14).

Parsiyel TTÜO' 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 (27, 28).

Ratlarda yapılan bir çalışmada TTÜO düzeltildikten sonra, benzer tübüler değişiklikler gözlenmiştir. (29). Ratlarda onsekiz saatlik TTÜO esnasında, medullanın iç kısmındaki plazma akımının azaldığı ve bu akımın, üreteral obstrüksiyonun giderilmesinden sonra arttığı bulunmuştur (29). Histolojik çalışmalarda hem iç hem de dış medullada nekroz görülmüştür. Obstrüksiyonun medulla üzerindeki bu fiziksel etkisi, TTÜO sonrası, böbrekte idrarı konsantre edebilme yeteneğinin azalmasının nedeni olabilir (29).

Hanley ve Davidson da böbreğin obstrüksiyondan sonra idrarı konsantre edemediğini tanımlamıştır (30). İdrarın konsantre edilememesinin toplayıcı kanalların ya antidiüretik hormon (vazopressin) ya da cAMP stimülasyonuna yanıtsızlığı ile ilişkili olduğu; bu stimülasyondan herhangi birine toplayıcı kanalların yanıtında %76 azalma görüldüğü bildirilmiştir (30). TTÜO ile birlikte prostoglandin E2 (PGE2) üretiminde bir artış olmaktadır. PGE2'nin vazopressinin tübüler etkilerini inhibe ederek, TTÜO sonrası böbrekte serbest su kaybını arttırdığı da bilinmektedir (30).

Akuaporinler, membran su kanalları ailesinden olup, transmembran su hareketine moleküler bir taban oluşturmaktadır (31). Akuaporin-2, toplayıcı kanalın predominant vazopressin-sensitif su kanalıdır. Frokiaer ve arkadaşları TTÜO' da akuaporin ekspresyonundaki değişiklikleri incelemiştir (32). Yirmi dört saatlik TTÜO ile akuaporin ekspresyonunda %77' lik azalma olduğunu ve bu TTÜO giderilmesinden sonra en az 24 saat sürdüğünü bildirmiştir. Obstrüksiyonlu böbrekte serbest su klirensinin artması akuaporin ekspresyonu azalması ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Obstrüksiyondan sonra böbreğin distal hidrojen iyon sekresyonu bozulur. Bu bikarbonat yüklenmesi sonrası parsiyel karbondioksit basıncının (PCO2) artmaması yanı sıra sodyum sülfat verilmesiyle bozulan üriner asidifikasyon ile kendini gösterir.

TTÜO' nun giderilmesi sonrası fraksiyone fosfat ekskresyonu obstrüksiyonlu böbrekte belirgin bir şekilde (%3,4) azalırken, sağlıklı böbrekte (%35,3) artar. Buna, yine obstrüksiyonlu böbrekte normal böbreğinkine

oranla iki kat artan fraksiyone sodyum ekskresyonu eşlik etmektedir. Ancak, fosfat ekskresyonundaki azalmanın filtre edilen fosfat yükünün azalmasına sekonder olduğuna inanılmaktadır. Su ve tuzdaki ekskresyon artışı distal nefrondaki azalmış geriemiime ikincildir.

Haris ve Yarger; 24 saatlik TTÜO'dan sonra ipsilateral böbrekte potasyum ekskresyonunun belirgin azaldığını tanımlamıştır (33). Potasyum ekskresyonundaki azalma; "TTÜO dan sonra distal tübüler volüm akım oranı azalmaktadır, TTÜO esnasında distal nefrondan geçen sodyum miktarı da azalmıştır, ve direkt mekanik obstrüksiyon nedeniyle normal potasyum sekretuar mekanizmaları engellenmiştir" şeklinde açıklanmıştır.

2.1.5 Tek Taraflı Üreteral Obstrüksiyonda Fizyolojik Değişiklikler

Üreterin tek taraflı tıkanması, renal kan akımı (RKA) ve üreteral basınç arasındaki karakteristik üçlü ilişkiyle sonuçlanır (34). İlk 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'da daha fazla bir azalma ile devam eder. Hemodinamik olarak, faz I afferent arteriyolde bir vazodilatasyon ile karakterizedir, bunu takiben faz II' de efferent arteriyolde vazokonstriksiyon ve faz III' te afferent arteriyolde vazokonstriksiyon meydana gelir. TTÜO'nun üçüncü fazı vazokonstriktif fazdır. Bu faz hem RKA hem de üreteral basınç azalmasına yol açan preglomerüler ve postglomerüler vazokonstriksiyon ile karakterizedir.

TTÜO' dan 24 saat sonra süperfisyel kortikal doku perfüzyonunda anlamlı bir azalma ve jukstaglomerüler glomerüllerin perfüzyonunda bir yükselme olduğu bildirilmektedir (35). Yarger ve Griffith TTÜO' dan 24 saat sonra obstrüksiyonlu böbrekte efektif renal plazma akımının (ERPA), kontrol değerinin %55'i dolayında olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda, üreteral oklüzyon sırasında mikrosfer enjeksiyonu kullanarak, intrarenal kan akımının jukstamedullar nefronlarda arttığını, buna karşın dış kortikal nefronlarda kan

akımının azaldığını ortaya koymuştur (36). İntrarenal kan akımındaki bu değişimin, iç medullaya oranla dış kortekste renin seviyesinin nispeten daha fazla artmasıyla açıklanmaktadır. Glomerüler yapı çalışmaları, TTÜO'ya eşlik eden zayıf glomerüler perfüzyonu göstermektedir. Obstrüksiyon sırasında GFR'nin direkt ölçülmesini sağlayan "etilendiamintetraasetikası" (EDTA) Cr51'in devamlı infüzyonu ile yapılan çalışmalar TTÜO'nun başlangıcından sonra GFR de %75'lik bir azalma olduğunu göstermektedir (37).

TTÜO'nun faz I ve III'ündeki fizyolojik değişikliklerin karakteristikleri belli zamandır bilinmekle birlikte, 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 aşikar hale geldi. RKA'daki akut ve kronik değişikliklerde anjiotensin II (AngII), nitrik oksit (NO) ve endotelin ve eikosanoidlerin (prostaglandinler ve tromboksan) rolünü belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır (38).

2.1.6 Tek Taraflı Üreteral Obstrüksiyonda Anatomiik Değişiklikler

TTÜO böbrek mimarisindeki değişiklikler ile birlikte. En önde gelen interstisyel değişiklik fibrozis, kollajen ve diğer ekstrasellüler matriks komponentlerinin birikimidir. Fibrozis ile birlikte İnterstisyumun sellüler kompozisyonundaki değişikliklerin yanısıra çok sayıda diğer biyolojik aktif moleküllerin ekspresyonunda da değişiklikler olur. İnterstisyel fibrozisin tübüleri ve interstisyel kapillerleri oblitere ederek böbrek hastalıklarının çoğunda renal fonksiyon azalmasının majör belirleyicisi olabileceği varsayılmaktadır (39).

İnterstisyumdaki değişiklikleri hedef alan deneysel stratejiler geliştirilmektedir. Bu stratejilerin TTÜO tedavisine medikal katkı olarak gelecekte rol alacakları düşünülmektedir.

Üreteral obstrüksiyon sonrası böbreğin görünümü; pelvisin intrarenal ya da ekstrarenal olması, obstrüksiyonun süresi ve derecesi, ve enfeksiyon olup olmamasına göre değişir. İntrarenal toplama sisteminin etrafındaki renal parankimin varlığı, sistemin dilate olabilmesini kısıtlar. Bununla birlikte, ekstrarenal bir toplama sisteminin ekspansiyonu renal parankim tarafından engellenemez. Bundan dolayı, intrarenal sistem aynı derece ve sürede obstrüksiyonlu olsalar bile ekstrarenal sistemle aynı derecede hidronefroz göstermeyebilir; ancak renal hasarın derecesi daha kötü olabilir.

Akut komplet üreteral oklüzyon, özellikle de intrarenal toplayıcı sistem varsa, toplayıcı sistemdeki değişiklikler çok az olabilir. Bu koşullarda toplayıcı sistem dilatasyonunun gelişmesi birkaç gün alabilir. Kronik obstrüksiyonda yine obstrüksiyonun uzunluğu ve derecesine göre, aynı zamanda toplayıcı sistemin intrarenal ya da ekstrarenal oluşuna göre böbrek genişlemiş, normal ya da atrofik olabilir. Toplayıcı sistem dilatasyonu, özellikle de ekstrarenal toplayıcı sistemi olanlarda, genellikle zamanla olur ve renal papillaya yavaş yavaş giderek artan kompresyona yol açar. Zaman içerisinde toplayıcı sistem öyle bir noktaya kadar genişler ki, kaliksler arasındaki doku inceler. En sonunda, kaliksler aralarındaki ince septa ile birleşir ve parankim periferde bir "kenar" ya da "kabuk" şeklinde kalır

2.1.7 Üst Üriner Sistem Obstrüksiyonunda Patofizyoloji

Üst üriner sistemin herhangi bir yerinde olan obstrüksiyon ile toplayıcı sistemde idrar birikimi, buna bağlı lümen içi dinlenme basınçlarında artış ile birlikte üreterde hem uzunlamasına ve hem de çapta artışlar meydana gelir (40). Uzamış obstrüksiyonlarda sirküler kas liflerinin kontraksiyonu ve uyumu bozulduğundan yüksek intraluminal basınçlar böbreğe kadar iletilir. Akut komplet obstrüksiyondan sonra obstrüksiyonun hemen üstünde ve pelviste gittikçe artan bir genişleme olur. Üreterin proksimali ve böbrek pelvisi kas yapısında hipertrofi ve hiperplazi meydana gelir. Daha sonra kas dokusunun yerini kollajen ve elastik lifler alır ve myojenik impuls bozulur. Üreter distaline

doğru devam eden peristaltik aktivite obstrüksiyonun olduğu yerde retrograd peristaltizme dönüşebilir. Bu durum iki hafta devam eder. Zamanla kas gergin ve iskemik hal alır ve atoni başgösterir. Üreterdeki bu basınç azalması, renal kan akımında azalma ile bunun sonucunda glomerüler filtrasyon hızında ve intratubüler hidrostatik basınçta düşüş gibi böbrek içindeki hemodinamik değişikliklerle açıklanabilir (40). Obstrüksiyon üreterde ise, üst üreter segmenti genişler; olay kronik ve inkomplet seyirli olduğunda üreter uzar ve kıvrımlar meydana gelerek dekompanze döneme girer. Deneysel olarak üreterdeki obstrüksiyonun etkisi çalışılmış ve 2 haftalık tam obstrüksiyon sonrası üreter kesitlerinde kas alanında %250, üreteral uzunlukta %24 ve üreter dış çapında %100 artış olduğu saptanmıştır (40). Hem kas hipertrofisine hem de kasılabilirlikteki artışa rağmen idrar iletimi için gerekli basınçların oluşturulmasında dilate bir üreter normal bir üretere göre daha az kabiliyetlidir. Bu azalma obstrüksiyon sonrası üreter çapındaki artışa bağlanabilir(40). Gerek parsiyel gerekse komplet obstrüksiyonda renal pelviste kritik volümlerde renal pelvis kapasitesi doluncaya kadar bir uyum izlenir. Daha sonra pelvisin aşırı dilatasyonu sonucu hızlı bir basınç artışı olur. Bu aşamada iki fizyolojik olay meydana gelir:

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

Bu fizyolojik etkileşimin sonucunda da küçük pelvis veya intraranal pelvisli böbreklerde daha çabuk yüksek basınçlar oluşurken , büyük veya ekstrarenal pelvisli böbreklerde daha geç yükselir ve daha uzun süre böbrek fonksiyonları korunur. Bu tip böbrekler obstrüksiyona uzun süre ciddi patolojik değişiklikler olmadan dayanabilirler.

Dilatasyonun ilerlemesi ve dengeye erişip stabil hal alması birçok fizyolojik faktörlere bağlıdır:

- 1-İdrar miktarı ve akım hızı
- 2-Obstrüksiyonun komplet veya inkomplet oluşu
- 3-Pelvisin anatomik konumu

4-Glomerüler ve tübüler fonksiyon

5-Renal pelvis kompliansı

Yüksek basınç ve akut obstrüksiyonun ilk birkaç gününde pelvis ve kalikte dilatasyon ve ardından papillalarda yassılaşma, fornikslerde yırtılmalar meydana gelir. Bu bulgular özellikle böbreğin üst ve alt polündeki papillalardaki bertini kolonlarının açıldığı yerlerde daha belirgindir. Daha sonra geri basıncın artması ile distal nefron ve kollektör kanallarda da dilatasyon ortaya çıkar. Obstrüksiyonun 7. gününde dilate kollektör kanallarda başlayan nekroz ve atrofi, 28. günde medüller kalınlığının %50' sinin kaybı ve 8. haftada ise parankim kalınlığının 1 cm'ye kadar inmesiyle sonuçlanır. Bu arada böbrek ağırlığı ilk dönemlerde perirenal ve periüretreal ödem nedeniyle artarken, daha sonra doku atrofisinin gelişmesiyle azalış gösterir (11).

Obstrüksiyonda artan pelvis içi basınç nedeniyle idrar sentezinin devamını sağlamaya yönelik basınç azaltıcı koruyucu mekanizmalar devreye girebilir. Bunlar:

1-Pyelointerstitiyel Reflü: Basınçla yırtılan papilla ve fornikslerden idrarın böbrek sinüsü ve perirenal alana geçmesi oradan da hem venöz yolla hemde lenfatiklerle taşınmasıdır.

2-Pyelolenfatik Reflü: Böbrek lenf sıvısı hiler ve kapsüler lenfatikler aracılığıyla drene olur. Böbrek lenfatik volümü yaklaşık idrar akımı kadardır ve üreter obstrüksiyonu, su diürezisi gibi durumlarda daha da artar. Böbrek lenfatiklerinin akut obstrüksiyonda natriüez ve diürez oluşur.

3-Pyelovenöz Reflü: Venalara direkt dönüşümdür ve en az etkili koruma sistemidir (11).

2.1.8 Üst Üriner Sistem Obstrüksiyonunda İskemi - Reperfüzyon Hasarı

Üst üriner sistem obstrüksiyonlarında böbrek hasarı, ilk aşamada artan üreteral basıncın etkilenmesi ile başlarken daha sonra ortaya çıkan renal kan

akımındaki azalmayla doku iskemisi ve hücrel atrofı meydana gelir ve nekrozla sonuçlanır. TNF- a, iskemik renal hasar süresince enflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve renal tubuler hücre apoptozisini uyarma kapasitesine sahip potent proenflamatuvar sitokindir. TNF- a, bu şekilde fibrozise sebep olmaktadır.

İntrapelvik basıncın artmasıyla RKA arasında üçlü bir ilişki saptanmıştır: İlk faz, hem üreteral basınçta hemde RKA'da azalma yaklaşık 1-1,5 saat süren bir yükselmeye karakterizedir. Bu fazda ilk cevap artan prostaglandin sekresyonu nedeniyle preglomeruler vazodilatasyondur. Bunu faz II' de, RKA'da azalma ve üreteral basınçta oklüzyonun beşinci saatine kadar süren bir yükselme izler. Son faz, üreteral basınçta progresif bir düşme ile birlikte, RKA'da daha fazla bir azalma ile devam eder (11, 41). Hemodimanik olarak, faz I afferent arteriolde bir vazodilatasyon ile karakterizedir. Bunu takip eden faz II'de efferent arteriolde vazokonstrüksiyon ve faz III'de afferent arteriolde vazokonstrüksiyon meydana gelir. Faz III vazokonstrüksiyon fazıdır, bu faz hem RKA'da hem de üreteral basınçta azalmaya sebep olan preglomeruler ve postglomerüler vazokonstrüksiyon ile karakterizedir (16). RKA daha da azalır (17,18). Akım 24 saatte %70' e, 72 saatte %50' ye, 1. haftada %30' a, 4-6.haftalarda %18' e ve 8. haftada ise %12' ye kadar düşer (42, 43, 44).

Bu geç dönemdeki renal vazokonstrüksiyondan iki mekanizma sorumludur:

1-Renin -anjiotensin sistemi

2- Prostaglandin -tromboksan sistemi

TTÜO'da anjiotensin II'nin inhibe edilmesi ile hem renal fonksiyonların hem de renal parankimin korunabildiği gösterilmiştir. Anjiotensin II, glomerüler hemodinamikte değişikliklere sebep olan renal skarlanmayı artırır. Bu, profibrotik sitokinlerin ve TGF- B'nin sentez ve etkisi sonucu ile oluşmaktadır (11). Obstrüktif üropatilerde, hidronefrotik böbrekte TGF-B aşırı artar (45). A II inhibitörleri ve anjiotensin reseptör blokerleri, TGF-B intrarenal sentez ve aktivitesini azaltmaktadır. Kronik renal yetmezlikte, renin-anjiotensin-aldosteron sistemi böbrekte artabilir.

Renin-anjiotensin-aldosteron sistemi tubuler fonksiyonları bozuk ve üriner sodyum kaybı fazla olan obstrüktif üropatili çocuklarda önemli olabilir. Tek taraflı üreteral obstrüksiyonda renal fibroziste sodyum kaybı çok belirginleşir (11). Siklo-oksigenaz inhibitörleri ile prostaglandin-tromboksan sisteminin inhibe edilmesi ile sadece renal fonksiyonların bir miktar korunduğu ortaya çıkmıştır. Bunlara ilaveten obstrüksiyonun 4. saatinde böbrekte, prostaglandin E2 ve tromboksan A2 (Tromboksan A2 genellikle normal böbrekte bulunmayan, güçlü renal vazokonstriktördür) salgılandığına inanılan interstisyel fibroblast proliferasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonu başlar (46). Dördüncü saatte mononükleer hücrelerden salınmaya başlanan bu mediatörler 24. saatte tepe seviyesine ulaşırlar. Bu infiltratif hücreler (özellikle makrofajlar) anlamlı şekilde tromboksan A2 üretimini arttırır ve intrarenal vazokonstriksiyonun belirginleşmesi, renal vasküler rezistansın yükselmesi ve kan akımının azalmasına sebep olur. Bu lokal etki, tek taraflı obstrüksiyon modellerinde karşı taraf normal böbrekte gözlenmez. Nonobstrüktif dilatasyonlarda, gerçek obstrüksiyonda görülen renal vasküler rezistanstaki değişiklikler gösterilememiştir (46).

RKA'daki bu progresif azalma renal metabolizmayı da etkiler. Kan akımının azalması ile oksijen kullanımı düşerken, anaerobik glikoliz ve anaerobik dekarboksilasyon mekanizmaları artar. Yağ asiti ve alfa-ketoglutarat kullanımı azalır, glukoneogenez durur. Anaerobik glikolizin bir göstergesi olan laktat-pürivat oranı artar ve sitrat üretimi durur. Renal dokuda ATP, ADP ve AMP üretimi obstrüksiyondan bir gün sonra normalin %50-70'ine iner. Obstrüksiyonun devam etmesi halinde metabolik fonksiyonlar giderek bozulur ve 6. haftada geri dönüşümsüz hale gelir. Böbrek arterleri son arter olduğu için ve aralarında anastomoz olmadığından interlober arterlerden uzak bölgelerde iskemiden daha fazla etkilenir (11).

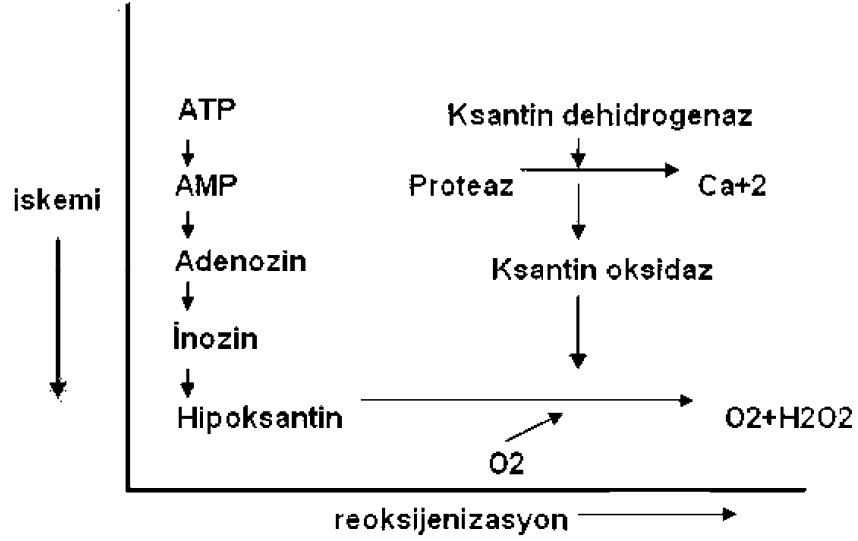
İskemi- Reperfüzyon (I/R) yaralanmasının temelinde mikrovasküler alandaki kan akımının akut kesilmesi bulunur. Bu akımsız dönemde, hücreler hipoksik ve hipoglisemik koşullar altında baskılanır ve hücre disfonksiyonu ile birlikte metabolik bozukluğa bağlı hücre ölümü gerçekleşebilir. Uygulanan tedaviler ile mikrovasküler kan akımı tekrar sağlanabilir ancak bu dönemde

ilk iskemi periyodunu takip eden ikinci bir azalmış akım dönemi ortaya çıkar. Stazın bu birincil ve ikincil periyodları akım/akımın geri dönmemesi (flow/ no reflow) fenomeni olarak adlandırılır (47, 48). Stazın bu ikinci fazının mekanizmasında mikrovasküler alanın nötrofiller (PMNL) tarafından doldurularak tıkanması rol oynar. PMNL'lerin hasarlanmış dokuya migrasyonu ile birlikte serbest oksijen radikallerinin üretimine ve aktive olan PMNL'lerden salgılanan yıkıcı enzimlere bağlı ikinci bir doku hasarı dalgası ortaya çıkar ve doku hasarının daha da şiddetlenmesine neden olur.

Akımın geri dönmemesi fenomeni büyük oranda PMNL'lerin vasküler endotele adezyonuna ve bunun sonucunda kan akımının kesilmesine bağlıdır. PMNL'lerin endotele bağlanması mikrovasküler kan akımını büyük oranda etkiler çünkü bir PMNL'nin volümü bir eritrositin iki katıdır ve tek bir PMNL dahi kapiller kan akımını kesebilir. PMNL'lerin damar duvarına bağlanması, PMNL hücre duvarında sürekli olarak sentezlenen adezyon molekülleri ile endotel tarafından sentezlenen indüklenebilir CAM arasındaki etkileşim sonucunda gerçekleşir (49, 50). PMNL'lerin aktivasyonu ve CAM indüksiyonu için gerekli sinyallerin iskemik alanlarda üretildiği düşünülmektedir. Damar endoteline tutunan PMNL daha sonra doku içerisine infiltratör olarak daha fazla hasar meydana getirir (51, 52).

Akımın geri dönmediği dönemde ortaya çıkan hasarın bir diğer komponenti de reperfüzyonun sağlanması ile ortaya çıkan serbest radikal hasarıdır. Serbest radikaller hasarlı dokudan salınabilecekleri gibi reperfüzyon sonrası PMNL tarafından da üretilirler. Bu süperoksit radikallerin büyük kısmının kaynağı ksantin oksidaz enzim sistemidir (53). Doku oksijenizasyonunun azalması ile birlikte düşen ATP üretimi enerji depolarının azalmasına neden olur ve hücre membranında bozulan iyon transportu hücre içi kalsiyum birikimine yol açar. Artan kalsiyum konsantrasyonu da ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürecek proteazları aktive eder (54). Bu arada ATP miktarının azalıp AMP miktarının artması ile birlikte hücre içinde adenozin, inozin hipoksantin dönüşümünün olduğu bir süreç ortaya çıkar (Şekil 1).

Şekil 1. İskemik Dokularda Ksantin Oksidaz Yolu İle Serbest Oksijen Radikal Üretimi (53, 54' ten uyarlanmıştır.)



Özetle, iskemik dokuda iki önemli değişiklik olur; birincisi yeni bir enzim aktivitesi yani ksantin oksidaz, ikincisi ise bu enzimin iki önemli substratından birisi olan hipoksantin oluşumudur. Diğer substrat yani moleküler oksijenin (O₂) de reperfüzyon ile birlikte ortama girmesi ile dokuda ani ve çok miktarda superoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşur. Ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri proteinlere, poliansatüre yağ asidlerine saldırır; enzim inaktivasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Serbest radikaller hücrede sarkolemma, sarkoplazmik retikulum ve ekstrasellüler kollajen matriks veya kontraktıl proteinler gibi organellerde bozukluklar oluşturur. Bunları takiben kalsiyuma bağlı mekanizmalarda bozukluklar ortaya çıkar. Serbest sitozolik kalsiyumun artışı protein kinazları, fosfolipazları ve diğer yıkıcı enzimleri aktive eder ve subsellüler hasarın artmasına yol açar. Aşırı kalsiyum yüklenmesi, oksijen radikalleri ile başlayan hasarı amplifiye eder.

2.2 İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARI

Bir organa gelen kan akımının böbrek transplantasyonu, şok, kardiovasküler cerrahi, parsiyel nefrektomi gibi çeşitli nedenlerle yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir. İskemi sonucunda doku hipokside kalır ve hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücrelölüm meydana gelir. Reperfüzyon ise dokuda kanlanmanın yeniden başlamasıdır. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda özellikle dokuya gelip yerleşen PMNL tarafından salınan SOR dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Bu olaya reperfüzyona bağlı doku hasarı denir (55).

Hücreler oksidatif hasarı önleyen, yok eden ya da kısmen azaltan mekanizmalara sahiptir. İskemi-reperfüzyon hasarında amaç, doku hasarına yol açan olayın etkisiyle tetiklenen biyokimyasal mekanizmaları, external yolla verilen maddelerle bir ya da birkaç basamakta engelleyerek organizmaya yardımcı olmaktır.

İskeminin süresine ve şiddetine bağlı olarak iki türlü hücrelölüm meydana gelir:

Geri dönüşlü zedelenme: İskeminin ilk zarar verdiği yer, hücrenin aerobik solunumudur. Oluşan hipoksi mitokondrideki oksidatif fosforilasyonu engeller. Adenozin tri fosfat (ATP) oluşumu yavaşlar ve durur. ATP kaybı hücre içinde çeşitli sistemleri yaygın olarak etkiler. Özellikle hücre zarının quabain duyarlı ATP aktivitesinin azalması zarda aktif sodyum pompasının yetersizliğine yol açarak hücre içi sodyum birikimi ve hücreden potasyumun dışarı atılmasına yol açar. Solid materyalin birikimine izoozmotik su birikimi eşlik ederek akut hücrelölüm oluşur (55).

İskeminin ilk dakikalarında aşırı stimüle olan glikolitik yol, ortamda sitrat, laktat, nikotin amid adenin dinükleotid (NADH) birikimi ve doku asidozunun gelişmesiyle inhibe olur. İskemik dokuda var olan oksijen ise oksidatif fosforilasyonu desteklemek için yetersiz kalır ve glikoliz sonucu oluşan piruvatın Krebs siklusuna değil de laktata dönüşü gerçekleşir. Böylece glikojenden ATP oluşumu ile hücre enerji kaynakları korunur. Glikojenin hızla

azaldığı histolojik olarak PAS ile boyamada görülebilir. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinden hidroliz sonucu oluşan inorganik fosfat birikimine neden olur. Sonuçta hücre içi pH düşer ve asidoz gözlenir.

Sonraki safha da granüllü endoplazmik retikulumlardan (GER) ribozomlar ayrılır ve polizomları monozomlara parçalar. Eğer hipoksi devam ederse, zar geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları azalır. Hücre yüzeyinde tomurcuklanmalar oluşur. Sitoplazmada ya da dışında organel zarları gibi plazmadan köken alan, konsantrik laminalı myelin figürler şekillenir. Bu sırada mitokondriler normal, şişmiş ya da yoğunlaşmıştır, GER genişlemiş ve tüm hücre belirgin olarak şişmiştir. Tüm bu bozukluklar oksijen verilince geri dönüşlüdür. Buna rağmen iskemi sürerse, geri dönüşsüz zedelenme oluşur (56).

Geri dönüşsüz zedelenme: Geri dönüşsüz zedelenme yapısal olarak mitokondri ve kristalarında aşırı vakuolizasyon, plazma zarında aşırı zedelenme, lizozomlarda şişme; özellikle iskemik alan yeniden beslenirse hücre içi yoğun kalsiyum tutulumu ile birlikte.

Amorf kalsiyumdan zengin yapılar mitokondri matriksinde gelişir. Mitokondride geri dönüşsüz zedelenmelerin erken bulguları 30-40 dakika sonra görülebilir. Proteinler, temel koenzimler, ribonükleik asitler (RNA) aşırı geçirgen zarlardan sürekli kaybedilir. Hücreler, hücre içi yüksek enerjili fosfatın yapımında kullanılacak ATP'nin yeniden oluşumu için yaşamsal önemi olan metabolitlerini de kaybederler. pH'nın düşmesi lizozom zarlarının zedelenmesiyle enzimlerinin sitoplazmaya geçerek, asit hidrolazların aktifleşmesiyle sitoplazmik ve çekirdek yapıların sindirimine neden olur. Hücre ölümünü izleyerek, hücre organelleri devamlı parçalanır ve hücrel enzimler hücre dışı mesafeye sızarlar. Sonuçta ölü hücreler myelin oluşumlar ve fosfolipidden oluşan büyük kitlelere dönüşürler. Bunlar daha sonra diğer hücreler tarafından fagosite edilirler veya yağ asitlerine parçalanırlar. Bu yağ asitlerinin kalsifikasyonu kalsiyum sabunları oluşur (57).

Hücre içine kalsiyum girişiyle kalsiyumdaki net artış hücrenin iyonik dengesini bozar. Bundan sonra kalsiyum mitokondri içine sızmaya başlar.

Mitokondrinin kalsiyumla yüklenmesi sonucu hücre membranındaki proteazlar ve fosfolipazlar aktive olur. Fosfolipazların aktivasyonu, serbest yağ asidi ve lizofosfolipidlerin salınımına bağlı olarak hücre membranında toksik etkiler oluşur.

Bu etkilerin yanında araşidonik asit metabolizması başlatılarak, reperfüzyon sırasında sitotoksik ürünler üretilir. Proteazların aktivasyonu, hücre iskeletinin parçalanmasına neden olur. Enzim sisteminde değişimler meydana gelirken yine reperfüzyon esnasında SOR'nin oluşumu gerçekleşir ve hatta artar. İskemi sırasında oluşan hasarların, reperfüzyon hasarları için başlangıç teşkil ettiği saptanmıştır (58).

Reperfüzyon hasarının bilinen en az üç bileşeni mevcuttur. Bunlar; mikrovasküler hasar, hücre nekrozu ve hemorajidir. İskemiye maruz kalan her organda reperfüzyon hasarı oluşur. İskemi sırasında biyokimyasal olayların oluşumuyla kendini gösterir ve sonuçta süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi SOR'ların yanında kalsiyum artar ve sarkolemmal fosfolipidlerin kaybı meydana gelir (59).

Reperfüzyon hasarında en önemli rolü PMNL'ler oynar. İskemik dokuya gelen ve yerleşen bu hücreler birçok yoldan etki ederek iskemik dokuyu yok ederler. Polimorfonükleer hücreler, endotel lökosit adezyon molekülü (ELAM-1), intersellüler adezyon molekülü (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) ve L-selektin gibi adezyon moleküllerine tutunarak iskemik dokuya yerleşirler (60).

Bu hücreler, iskemik dokuyu hem oksidatif (oksijen radikalleri ile) hem de nonoksidatif yolla tahrip ederler. Nötrofil granülleri, vasküler yaralanmaya neden olabilen bir çok hidrolitik enzim ve antimikrobiyal polipeptid içerirler (61).

İskemik dokudaki polimorfonükleer hücre bağımlı yıkımda ayrıca fosfolipaz ürünleri tromboksan-A₂, prostoglandin E₂, lökotrien C₄, D₄, B₄ ve platelet agrege edici faktör (PAF) üretilir. Bunlar da çeşitli yollardan doku hasarını artırır (61, 62).

2.2.1 İskemi - Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi

Renal iskemiden sonra oluşan intrarenal vazokonstrüksiyon ve tübül disfonksiyonu; azalmış GFR'nin iki temel mekanizması olarak tanımlanmaktadır.

Tübül obstrüksiyonu ve glomerüler filtratın geriye doğru sızıntısının ilerlemesi GFR'yi düşürür. Dış medullada yerleşmiş olan proksimal tübülün pars rektası ve daha az derecede olmak üzere henle kulbunun çıkan kolu iskemik hasara en hassas nefron segmentidir. Bunun sebebi belki de aktif solut transportu için yüksek ATP ihtiyacı göstermesi ve dış medullanın böbreğin diğer bölgelerinden daha hipoksik olmasıdır (63).

Reperfüzyon sırasında, korteks ve papillada oksijen oranı düzelmiş iken, dış medulla tamamen hipoksik kalır. İntrarenal vazokonstrüksiyon ve dış medulla hipoperfüzyonundan sorumlu mediatörün endotelin olduğu saptanmıştır (64).

2.2.1.1. Hücre İçi Kalsiyum Artışı

İskemi sırasında ilk olarak membran potansiyeli azalır ve hücre membran geçirgenliği artar (65). Bu durumda kalsiyum hücre içine girer (66). Kalsiyum voltaj ya da reseptör bağımlı kanallardan sodyum veya hidrojen iyonu ile değişerek geçer veya hasarlı hücre membranından direkt olarak geçer (67, 68).

Normalde kalsiyumun %10'u hücre membranına bağlı, %60-70'i intrasellüler organellerde, %10-20'si sitozolde serbest olarak bulunur (69). Biyolojik olarak aktif form serbest kalsiyumdur. İskemi sonucunda kalsiyum hücre içinde yeniden dağılır ve hücrede kalsiyum birikimi gözlenir. Hücre içi kalsiyumun artması sonucu mitokondriyel solunum fonksiyonu bozulur ve ATP azalır. Hücre içi yüksek fosfatlı enerji kaynaklarının azalması ile aktif transport mekanizmaları hasarlanır ve sonuçta hücre içi kalsiyum daha da artar ve artmış permeabilite sonucu membran fosfolipazları aktive olur (70).

Kalmodulin kalsiyumun regülatör proteinidir ve fosfolipaz aktivitesini de kontrol eder. Kalmodulin metabolizması iskemi sırasında değişebilir (71). Kalsiyum sitozolik serbest yağ asitlerini artırır ve serbest yağ asitleri hücre membranında deterjan etkisi gösterir. Ayrıca kalsiyum aktin ve mikrotübül destrüksiyonu sonucu organellerinin hücresel yapısını bozar (72, 73). Oluşan serbest radikaller ve kalsiyum ile birlikte hücre lipidleri; hücre membranını yıkar. Ayrıca hücre içi enzimlerinin fonksiyonlarını bozar (74).

NADPH'nin NADP'ye oksidasyonu sırasında serbest oksijen radikalleri oluşur. Bunlar H₂O₂, hidroksil (OH) ve diğerleridir. Normal şartlarda oluşan serbest radikaller de hücreye zararlıdır fakat glutatyon peroksidaz enzimi ile etkileri önlenmektedir. Ancak limitli oksijen varlığında serbest oksijen radikallerinin yapımı belirgin artar. Serbest radikaller lipid peroksidasyonuna ve kalsiyum ise mitokondiyal disfonksiyona neden olur (75).

2.2.1.2. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri; dış yörüngesinde tek sayıda serbest elektron bulunan, kimyasal olarak reaktif atom veya moleküllerdir. Organizmada 'süperoksit' ve 'hidroksil' gibi serbest radikallerin yanında, 'hidrojen peroksit' ve 'hipokloröz asit' gibi radikal olmayan ancak serbest radikal oluşturma potansiyeli bulunan zararlı oksijen türevleri de oluşabilmektedir (76, 77).

SOR, aerobik canlılarda belirli oranlarda oluşmaktadır. Fagositik hücrelerin yabancı mikroorganizmalara karşı savunma mekanizmalarında önemli rol oynarlar. Serbest radikaller, paylaşılmamış elektronlarından dolayı, protein, karbonhidrat ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek bu moleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar (78). Serbest oksijen radikallerinin, hücre bileşenleri ile oluşturdıkları reaksiyonlar şunlardır:

- Proteinler: Serbest radikaller, aminoasitler ile reaksiyona girerek protein yapısındaki enzimlerin spesifik aktivitelerini ortadan kaldırır. Protein bağlanma ve enzim aktivitelerinde farklılaşma ortaya çıkan hücrede fonksiyonel bozukluklar oluşturur (79).

- Karbonhidratlar: Serbest radikaller, polisakkarit polimerizasyonunda artışa neden olurlar. Glukoz gibi monosakkaritlerin oto-oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, diğer peroksitler ve oksialdehitler oluşur. Böylece moleküler yapı bozularak işlevini kaybeder (80).
- Nükleik asitler: Serbest radikaller, DNA zincirinde kırılmalar meydana getirirler ve DNA hasarı sonrası aktive olan 'polimeraz' enzimi ile reaksiyona girerek DNA'nın onarımına engel olurlar (81).
- Lipidler: SOR, hücre membranlarındaki kolesterol ve doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatırlar (82, 83).

İskemi-reperfüzyon hasarı sonucunda; serbest oksijen radikalleri aracılığı ile oluşan lipid peroksidasyonunun hücre membranı için önemli yıkıcı etkileri olduğuna inanılmaktadır. Poliansatüre yağ asitleri membran bütünlüğünü bozmaktadır. Lipid peroksidasyonu; hücre membranının akışkanlığının ve geçirgenliğinin değişimine neden olur. Sonuçta membran proteinleri de degrade olur ve tüm bu süreç reperfüzyon hasarı sonucunda oluşan hücre ölümüne yol açan önemli etkenlerden sayılmaktadır (84). Lipid peroksidasyonunun doku ve plazmadaki son ürünü MDA'dır ve yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda lipid peroksidasyonunun belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (85,86).

Süperoksit radikalının ana kaynağı, post-iskemik endotelyumdur. Normal koşullar altında süperoksidin zararlı etkileri, süperoksit dismutaz (SOD) tarafından engellenir. SOD; süperoksidi hidrojen perokside dönüştüren bir enzimdir. Reperfüzyon esnasında bu doğal savunma mekanizması eksiktir. Böylece hidrojen peroksit, aminoasitler, membran transport proteinleri, sitokrom enzimleri ve nükleik asitlere oldukça zararlı olan hidroksil radikaline dönüşür (87).

Günümüzde iskemi-reperfüzyon hasarının azaltılmasına yönelik çalışmaların çoğu, bu 'serbest oksijen radikallerinin temizlenmesi' üzerine yoğunlaşmaktadır ancak halen pratikte rutin kullanıma geçecek etkin bir madde bulunmuş değildir (88).

2.2.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nitrik Oksit

Endotel türevli ve çok önemli bir endojen vazodilatör olan NO'nun biyolojik sistemler üzerinde çeşitli fizyolojik ve patolojik etkisi bulunmaktadır. NO enzimatik olarak NOS enzimi aracılığıyla L-argininin terminal guanido nitrojen atomunun oksidasyonu ile yapılır (89-93).

Üç farklı NOS enzimi vardır; endotelial izoform (eNOS), nöronal izoform (nNOS) ve üçüncüsü de normal koşullarda üretilmeyen ancak inflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenebilen (iNOS) formdur. Ayrıca iNOS, endotoksemi, hemorajik şok, sepsis gibi olaylarda da rol alır. (89, 92-96). nNOS ve eNOS izoenzimleri NO üretimi için kalsiyum (Ca^{2+}) bağımlı iken iNOS bağımsızdır (93, 94).

NO sentezi damarlarda başlıca "shear stres" ile tetiklenir. Bu fenomen, kalbin her sistolde kanı damarlara göndermesi sonucu damar endoteli yüzeyinde oluşturduğu mekanik etki (sürtünme, yalama) 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. Damar endotelinden NO üretimine neden olan en önemli fizyolojik stimulus bu fenomendir ("shear stres"). İlginç olarak bu şekilde NO üretimi için Ca^{2+} 'a gerek yoktur, eNOS'un fosforile edilerek aktive edilmesi yeterlidir. Diğer taraftan hücre içi Ca^{2+} düzeylerini arttıran bileşikler de (Ach, histamin, bradikinin, trombin, glutamat, P maddesi, serotonin, noradrenalin, tromboksan A_2 , ET-1, ATP, anjiotensin II, vd.) vasküler endotelyumda fosfolipaz C enzimi üzerinden Ca^{2+} 'a bağımlı bir enzim olan eNOS enzimini aktive ederler (97).

NO bir kez sentezlendikten sonra hızla hedef dokulara yayılır ve hücre içinde guanilat siklaz enzimini aktive ederek düz kas kasılmasını sağlayan cGMP miktarını artırır (98,99) NO aynı zamanda trombositler içindeki çözülebilir guanilat siklaz aktivitesini de arttırarak trombosit adezyon ve agregasyonunu azaltır. NO, plateletlerin homotipik (platelet-platelet) ve

heterotipik (platelet-lökosit) agregasyonunu ve lökosit-endotel hücre adezyonunu inhibe eder. NO veya nitrovazodilatörler tarafından sentezi arttırılan cGMP, cAMP fosfodiesterazı inhibe ederek siklik adenosin monofosfat (cAMP) düzeyini yükseltir ve platelet agregasyonunu inhibe eder. Prostosiklinlerle NO arasındaki sinerjik etkinin nedeni budur (100).

NO, ayrıca immünolojik sataşma sonucu Ca^{2+} 'dan bağımsız olarak immün sistem hücreleri tarafından da üretilir ve bu hücrelerin selektif olmayan sitotoksik etkilerine aracılık eder. Ayrıca mikroorganizmaların mitokondrial proteine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip DNA sentezini bozarak yıkılmalarına yol açar ve savunma sisteminde rol oynar.

NO ve süperoksit anyonu spontan olarak toksik peroksinitrit ($ONOO^-$) iyonunu oluşturmak üzere reaksiyona girerler. Peroksinitrit oldukça kuvvetli ve değişken bir oksidan olup lipid, protein ve DNA ile reaksiyona girer (90, 101). Bu reaksiyonlar NO' in çok sayıdaki sitotoksik etkisini açıklayabilir. Çünkü hem süperoksit anyonu hemde NO dokuda İ/R hasarına katkıda bulunur (101). Peroksinitrit, protein tirozin nitrasyonu yoluyla veya OH ve NO' e ayrışarak dokuda direk oksidan hasara neden olur (90). Özellikle böbrekte peroksinitrit oluşumu İ/R patofizyolojisinde rol oynar (102).

2.2.1.4 Apoptozis Ve Caspase Arkı

Programlı hücre ölümü anlamına gelen "apoptozis", hem hücresel homeostazisin devamlılığı hem de hücre çoğalması ve farklılaşmasında çok önemli olan hücre eliminasyonu için gerekli fizyolojik bir işlemdir. Apoptozis ile organizmada hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücreler, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır. Bu işlem hem çok hücreli organizmaların normal gelişim süreci olan embriyogenezis sırasında, hem de erişkinlerde neredeyse bütün dokularda hücresel çoğalma ve yenilenme arasındaki homeostatik dengenin ve doku içeriğinin kararlılığının korunması için gereklidir (103, 104, 105). Fetusda normal doku gelişimin temel özelliğidir. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Çeşitli uyaranlar apoptozis mekanizmasını uyarır. Bunlara örnek olarak, TNF-a, hücre içi kalsiyum düzeyinin artışı,

glikokortikoidler, reaktif oksijen ürünleri, ultraviyole ışık, radyasyon, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar sayılabilir (104, 106).

Apoptozda asıl morfolojik olay, çekirdeğin yoğunlaşması ve parçalara ayrılmasıdır. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve hücre şişerken zar yapısı bozulur. Daha sonra zarda tomurcuklanmalar oluşur ve hücre sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınıp fagosite edilirler. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma zarındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre zarının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle zarın dış tabakasına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (107).

Apoptozisde hücresel yapının bozulmasının nedeni, Na, K ve Cl taşıyıcı sistemin durması sonucu hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptoz uyarısını alan hücre çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovilluslarını kaybeder. Elektron mikroskopunda gözlenen değişiklikler ise öncelikle hücre zarının şeklinin bozulmasıdır ve bunu takiben kabarcıklaşmalar oluşur ki bu yapılar 'zeiozis' adını alırlar. Zardaki tomurcuklaşma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetric olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu sonucu fosfatidilserin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanması ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptoz 30- 60 dakika gibi kısa bir sürede tamamlanır. Elektron mikroskopunda apoptozis sırasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma zarının kabarması, mitokondri dış zarında şişme, mitokondrial membran aralığına sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan

Apoptozis İndükleyici Faktör (AİF) salınımı en önemli morfolojik değişikliklerdir (107).

Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Apoptoz mekanizması henüz tam anlaşılamamakla birlikte asıl önemli olanın kaspazların aktivasyonu olduğu düşünülmektedir (103). Proteaz ailesinden olan ve yapılarında sistein içeren bu enzimler tüm hücrelerde inaktif pro-enzim halinde bulunurlar. Ölüm sinyali olarak da kabul edilen kaspazlara karşı çeşitli virüslerde kaspaz inhibitörleri saptanmıştır (108). Uyarana bağlı olmak üzere 2 temel mekanizma aracılığıyla apoptozis başlatılır (103, 104, 109).

1. Hücre içi uyarılar aracılığı ile
2. Hücre dışı uyarılar aracılığı ile

Birçok apoptotik uyarı, sonuçta mitokondri/apoptozom ölüm yolağı oluşturacak hücre organellerinde metabolik strese neden olabilirler. Apoptozisin çeşitli uyarıları doğrudan ya da dolaylı mitokondriden sitokrom c serbestlenmesine etki eder. Sitokrom c'nin sitoplazmaya sızması mitokondri/apoptozom bağımlı (intrinsik) ölüm yolağında anahtar olaydır. Bcl 2 ailesinin bazı üyeleri bu yolağın kontrolünde önemli rol oynarlar. Bcl 2 gen ailesi üyeleri, kendi içlerinde birbirlerine antagonist çalışarak apoptozu uyarıran veya engelleyen bcl 2 proteinlerini kodlarlar. Bu proteinlerden pro-apoptotik olanlar (Bax, Bak, Bok, Bad, bid, Bim, Bmf) apoptozu uyarırken anti-apoptotik olanlar (Bcl-2, Bcl-x_l/ Bcl-w) apoptozu engellerler (110, 111, 112). Bcl 2 gen ailesi üyelerinin oranı, hücrelerin yaşamasını veya ölmesini belirler. Bunların ekspresyon düzeyleri ve aktivasyon aşaması sitokrom c, prokaspaz 2, 3, 9, AİF, endonükleaz G, Smac/DIABLO gibi apoptozu yol açan moleküllerin salınımına etki eder. Bütün bu faktörler Bax/Bak kanalları ya da mitokondriyal membrandaki spesifik olmayan porlar tarafından serbestlenir. Prokaspaz 9'un aktivasyonu dATP ya da ATP'nin varlığında Apaf 1 ve sitokrom c tarafından kolaylaştırılır. Sitokrom c, Apaf 1, kaspaz 9 ve dATP ya da ATP birleşerek moleküler ağırlığı yaklaşık 700 - 1400 kDa olan apoptozom ile büyük bir bileşik oluşturur. Apoptozom üretimindeki

anahtar oyuncu mitokondridir. Bununla birlikte kaspaz 9, aktive olur ve apoptotik hücre ölümü yolağında kaspaz 3, 6, 7 aktive edilir ve apoptozis gelişir (105, 109)

Bir diğer yolak da tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinden, ölüm reseptörlerinin aracılık yaptığı hücre dışı uyaranlar aracılığı ile oluşur. Bu yolak ölüm ligandının kendi reseptörüne bağlanması ile başlatılır. Şu ana kadar, ölüm reseptör ailesinin insanda en az sekiz tanesi tanımlanmıştır. Bunlar; Fas (CD95), TNF-R1, DR-3 (Apo-3, WSL-1, TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2), DR-6, EDA-R (ektodermal displazi reseptörü) ve NGF-R'dir. Ölüme neden olan reseptörler sitoplazma içinde ölüm alanı (DD, "dead domain") olarak adlandırılan bir bölge taşırlar. Ölüm reseptörü olan Fas (CD95), hücre yüzey reseptörü olup tümör nekroz faktör ailesinin en iyi tanımlanmış ölüm reseptörlerindendir. Apoptotik işaretin uyarıcısı olan Fas, birçok hücre tipinde sergilenir. Fas ligandı da (FasL) TNF ailesinin bir üyesidir. FasL'nin hedef hücredeki Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik işlem başlar. Bu mekanizma, bir immün tepki sonunda aktive olmuş T hücrelerinin uzaklaştırılması, virüs infekte hedef hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar (105, 112).

Ligandın hedef hücredeki reseptörüne bağlanmasını DISC formasyonunun oluşumu takip eder (105, 109, 111). Ölüm reseptörüne kendi ligantlarının bağlanması hücre içinde adaptör proteinin de FADD reseptöre bağlanmasına yol açar. FADD, bu kompleks içerisinde sırasıyla pro-kaspaz 8 ve 10'nun çalışmasına olanak verir. DISC'deki bu proenzimlerin yakın ilişkisi bunların katalitik aktivitesine, muhtemelen bir allosterik mekanizma tarafından pro-kaspaz 8 veya 10 molekülleri arasındaki dimerizasyona neden olur. Pro-kaspaz 8 aktif hale geçince kaspaz 8 oluşur ve kaspaz 8 direk hedef proteinleri bölerek apoptoza yol açan kaspaz 3'ü aktive eder (109, 111). DISC içindeki kaspazların aktivasyonu hücre içi proteinlerden FLICE-inhibitör proteini (cFLIP) tarafından inhibe edilebilir. Bu proteinler hem DISC'i çalıştırabilir hem de kaspaz 8 ve 10'nun aktivasyonunu baskılar (109).

Eksojen H_2O_2 gibi SOR'lerinin orta düzeyleri birçok farklı hücrede apoptoza neden olur. Endojen üretilen SOR'lerinin hücre içinde bulunması da apoptotik hücre ölümüne yol açmada çok önemlidir ve UV, kanser tedavi edici ilaçlar ve sitokinler gibi birçok uyarılar tarafından tetiklenir (113). Son zamanlarda apoptoza karşı koruyucu etki gösteren antioksidanlarla yapılmış pek çok çalışma vardır (114, 115, 116)

2.2.3. İskemi/ Reperfüzyon Hasarında Hiperbarik Oksijen Tedavisi

HBO tedavisi, literatürde yayınlanmış pek çok çalışmada miyokard, iskelet kası, ince barsak ve karaciğer gibi pek çok İ/R modelinde tedavi amaçlı olarak kullanılmış ve yararlı etkileri ortaya konmuştur (117-126). İlk bakışta, reperfüzyon sırasında ortaya çıkan oksijen kaynaklı serbest radikallerin hücre lipidleri, proteinleri ve nükleik asitleri üzerindeki etkileri düşünüldüğünde, HBO tedavisinin İ/R hasarı üzerine olumsuz etkilerde bulunacağı düşünülebilir. İskemik dokunun çok yüksek parsiyel basınçlı oksijen ile reperfüze edilmesinin in vivo gözlenen olumlu etkileri “oksijen paradoksu” olarak adlandırılır. HBO tedavisinin İ/R hasarının tedavisindeki olumlu etkisinin mekanizmaları gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır. HBO tedavisi İ/R hasarının nötrofiller, endotel, inflamatuvar mediyatörler, lipid peroksidasyonu ve mikrovasküler kan akımı gibi pek çok farklı bölümü üzerine olumlu etkiler göstermektedir.

İ/R hasarında HBO'nun etki mekanizması konusunda ilk görüşler HBO'nun iskemik iskelet kasında ödemi ve nekrozu azalttığı gözlemine dayanmaktadır (117, 127). PMNL doku yıkımı ve ödemi ile yakın ilgisinden dolayı İ/R hasarı sırasında HBO tedavisi çalışmalarının odak noktası haline gelmiştir (128, 129). Bu konuda yapılan çalışmalarda HBO'nun PMNL adezyonu ve mikrovasküler kan akımı üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (124). Yapılan in vitro çalışmalarda HBO'nun PMNL'nin adezyondan sorumlu CD18 bölgesinin fonksiyonunu PMNL siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini baskılayarak etkilediği gösterilmiştir (130). HBO tedavisi PMNL'nin

adezyonundan sorumlu bir diğ er komponent olan endoteli de adezyondan sorumlu CAM moleküllerinin sentezini baskılayarak etkiler.

 /R hasarında meydana gelen serbest radikal üretimi membran lipidlerinin peroksidasyonunu indükler ve bunun sonucu olarak da hücre ve organel membranlarında hasarlanma, hücre dengesinde bozulma ve ölüm meydana gelir. Reperfüzyon esnasında %100 oksijene maruz kalmanın lipid peroksidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (131). Oksijen kaynaklı serbest radikallerin  /R hasarını şiddetlendirici etkisi düşünüldüğünde HBO ile birlikte artacak olan doku pO₂ düzeylerinin hasarı arttıracağı akla gelmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda HBO' nun lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (120, 126, 132-135). Bu yararlı sonuçlar HBO'nun serbest radikal üretimini arttırdığı bilinmesine rağmen ortaya çıkmıştır. Bu paradoksun açıklığa kavuşturulması amacı ile yapılan çalışmada oksijenin lipid peroksidasyonu üzerine etkileri değerlendirilmiş ve yüksek basınçlarda oksijenin lipid peroksidasyonunu antagonize edebileceği ortaya konulmuştur (136).

2.3. HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ

HBO tedavisi, izole bir basınç odasında hastaya deniz seviyesindeki atmosferik basınçtan (1 ATA [atmosphere absolute] = 760 mmHg) 2-3 kat daha fazla bir basınçta %100 oksijen solutulması ile uygulanan bir tedavi seklidir. Maske, baslık veya endotrakeal tüp ile uygulanan HBO ile, arteriyel oksijen basıncı 2000 mmHg'ya, doku oksijen basıncı da 400 mmHg'ya kadar çıkarılabilir. Bu basınçla yapılan oksijen uygulaması biyokimyasal, sellüler ve fizyolojik birçok yarar sağlar (3).

2.3.1. Tarihçe

Priestly 1775 yılında keşfettiği ve sonradan "Oksijen" adı verilen bu yeni gaz hakkında şu ifadeyi kullanmıştır:

"... Bu çalışmalardan şu sonucu da çıkarabiliriz: Ayırtırdığımız bu saf hava tipta bir ilaç olarak yararlı olabilecekse de, sağlıklı bir vücutta kullanımı uygun olmayabilir. Bir kandil bu saf hava ile normal hava ile olandan daha hızlı yandığına göre yaşam da çok hızlı son bulabilir. Örneğin bir hayvanın gücü bu saf hava ile hızla tükenebilir. Ya da en azından bir ilahiyatçı bizlere bahsedilen doğal havanın bizim hakettiğimiz en iyi hava olduğunu söyleyebilir. Şu anda onu soluma ayrıcalığına yalnızca iki fare ve ben sahibiz. " (137)

Hiperbarik tedavi ilk kez 1662 yılında Henshaw tarafından yapılan ilk basınç tankının yapılması ile uygulanmıştır (138). Ancak Priestly ile hiperbarik oksijen kavramının gündeme gelebilmesi için 200 yıl geçmesi gerekmiştir (137).1887 yılına kadar basınç tankları bilimsel bir dayanağı olmasa da pek çok hastalığın tedavisi amacı ile kullanılmıştır (138, 139). Hiperbarik tıp alanındaki asıl gelişme, basınçlı tünel işçiliğinin önemli bir iş sahası haline gelmesi ve 1845'te Triger'ın Fransa'da Loire Nehri yatağının kazıldığı basınçlı tünel çalışmalarında disbarik problemlerin pek çoğunu tanımlaması ile başlamıştır. 19. yy başında Paul Bert ve Lorrian Smith oksijen toksisitesinin yol açtığı problemleri tanımladılar. Arntzenius 1887 yılında kayda değer 300 referansla birlikte o güne kadar olan hiperbarik tıp literatürünü topladı (138, 140, 141).

HBO tedavisi, 1930'lardan sonra Amerikan ve İngiliz Donanmaları tarafından, dekompresyon hastalığının tedavisinde rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır (142). 1950'lerin sonlarında ise kan gaz analizi ve gaz değişimi fizyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla, HBO tedavisi modern klinik kullanıma girmiştir. 1961 yılında Boereme ve Brummelkamp'ın HBO'yu gazlı gangrenli bir hastada kullanmaları ile klinik uygulamaya geçmiş ve 1963 yılında Amsterdam'da ilk uluslararası HBO toplantısı yapılmıştır (141). Son 20-30 yıldır, çok çeşitli akut ya da kronik bozuklukların tedavisinde primer tedavi yöntemi, veya diğer tedavilere yardımcı olarak kullanılmaktadır (143). 1970'lerin sonlarında Sualtı ve Hiperbarik Tıp Birliği (UHMS) tarafından Hiperbarik Oksijen Tedavisi Komitesi oluşturulmuştur ve bu komite günümüzde HBO tedavisi konusunda bilimsel otorite durumundadır.

2.3.2 Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Fizyolojik Temelleri

Hiperbarik oksijen tedavisinin temeli hiperoksinin fizyolojik ve biyokimyasal etkilerine ve gaz kanunlarına dayanır. Boyle-Mariotte yasasına göre, sabit bir ısıda, bir gazın hacim ve basıncı birbiriyle ters orantılıdır (144, 145). Baska bir deyişle, belirli bir ısıdaki gazın basıncı ile hacminin çarpımı daima sabittir. Bu kanun hiperbarik tedavinin pek çok etkisinden sorumludur. Bu nedenle tedavi sırasında basınç tankı içerisindeki ısı bir miktar yükselir, östaki borusunun tıkalı olması ve basıncın dengelenememesi durumunda orta kulaktaki yüksek basınca bağlı olarak şiddetli ağrı duyulabilir. Benzer şekilde nadir de olsa, ortam basıncının azalması sırasında akciğerlerde ekspansiyon olan gaza bağlı olarak pnömotoraks gelişimi söz konusu olabilir. Dalton kanunu, bir karışım içerisinde bulunan her gazın karışım içerisindeki miktarı oranında bir basınç meydana getireceğini ortaya koyar (parsiyel basınç) (146). Henry yasası ise; sabit bir ısıda, bir sıvı içinde ya da dokuda çözünmüş olan gaz miktarının sıvının ya da dokunun temasta olduğu gazın parsiyel basıncıyla doğru orantılı olduğunu belirtir (147). Bu HBO tedavisi sırasında oluşan artmış doku oksijen düzeyinin nedenidir. Bununla birlikte bu

kanun, basınç altında normal hava soluyan kişilerde oksijen dışındaki inert gazların özellikle de azotun kanda yüksek oranda çözünmesine neden olur. Basınç altında kanda çözünmüş halde bulunan bu nitrojen dekompresyon esnasında hava kabarcıkları oluşturarak hava embolilerine neden olur.

Kanda taşınan oksijenin büyük çoğunluğu hemoglobine (Hb) bağlı olarak taşınır (146). Normal atmosfer şartlarında (1 ATA=760 mmHg) hemoglobin %97 oranında doymuş halde bulunur. Bununla birlikte bir miktar oksijen de plazmada çözünmüş olarak taşınır. HBO tedavisi esnasında çözünmüş halde bulunan bu oksijenin miktarı artarak doku oksijenlenmesinde artış sağlanır. Normal basınçlı hava solunduğunda, kandaki oksijen basıncı 100 mmHg, dokudaki oksijen basıncı ise 55 mmHg civarındadır. 3 ATA basınç altında %100 oksijen solunduğunda ise kan oksijen basıncı 2000mmHg'ya, doku oksijen basıncı 500mmHg'ya yükselir (147). Normal basınçta 1 litre kanda 3 ml O₂ taşınabilirken bu şartlarda 60 ml O₂ taşınabilir ve bu sayede istirahat halindeki dokulara hemoglobin ile yarışmaya girmeden O₂ ihtiyacını karşılama olanağı sağlar (148, 149). Oksijen çözünmüş halde bulunduğu için, karbonmonoksit zehirlenmesi ve ciddi anemi gibi durumlarda dahi eritrositlerin giremediği obstrükte dokulara ulaşabilir. HBO tedavisi dokuda serbest oksijen radikallerinin üretimini arttırarak membran lipidlerinin peroksidasyonu ve DNA hasarı yolu ile anti bakteriyel etki gösterir. Özellikle anaeroblara karşı etkinliği bulunmaktadır. Ayrıca lökositlerin bakterileri öldürme mekanizması olan O₂ bağımlı peroksidaz sistemini uyarır (150). HBO ayrıca bazı antibiyotiklerin hücre içerisine girişini arttırarak sinerjistik etki gösterir. HBO, iskemik dokular ile çevre dokular arasındaki O₂ gradientini arttırır ve angiogenesis için gerekli olan oksijen bağımlı kollajen matriks üretimini uyarır (151, 152).

2.3.3 Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Endikasyonları

Hiperbarik oksijen tedavisi kimi ülkelerde etkinliği bilimsel olarak kanıtlanmış hastalıkların bile bir kısmında kullanılırken, kimi ülkelerde kontrendikasyonlar dışında kalan neredeyse tüm hastalıklarda denenmektedir.

Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı'nın özel hiperbarik oksijen merkezleri için kabul ettiği endikasyon listesi Tablo 2'de verilmiştir (153).

Tablo 2. Sağlık Bakanlığı HBO Endikasyon Listesi (153).

1. Dekompresyon hastalığı
2. Karbonmonoksit, siyanid zehirlenmesi, akut duman inhalasyonu
3. Gazlı gangren
4. Yumuşak dokunun nekrotizan infeksiyonları (deri-kas-fasya)
5. Yara iyileşmesinin geciktiği durumlar (Diyabetik ve non-diyabetik)
6. Hava veya gaz embolisi
7. Kronik refrakter osteomyelit
8. Kafa kemikleri, sternum ve vertebranın akut osteomyelitleri
9. Ani görme kaybı (Retinal arter oklüzyonu)
10. Ani işitme kaybı
11. Crush yaralanması, kompartman sendromu ve diğer akut travmatik iskemiler
12. Tutması şüpheli deri greft ve flepleri
13. Radyasyon nekrozları
14. Beyin absesi
15. Anoksik ensefalopati
16. Termal yanıklar
17. Aşırı kan kayıpları

Sualtı ve Hiperbarik Tıp Birliği (Undersea and Hyperbaric Medicine-UHMS) de 2003 yılında kesinleşmiş Hiperbarik Oksijen Tedavisi endikasyon listesi yayınlamıştır. Bu liste de Tablo 3'te verilmiştir (154).

Tablo 3. UHMS Tarafından Belirlenen HBO Endikasyon Listesi (154).

- 1.Hava veya gaz embolisi
- 2.Karbondioksit intoksikasyonu/ siyanür intoksikasyonu
- 3.Gazlı gangren
- 4.Akut travmatik iskemiler (crush yaralanması / kompartman sendromu)
- 5.Dekompresyon hastalığı
- 6.Seçilmiş problemli yaralarda yara iyileşmesine destek
- 7.Aşırı kan kaybı (anemi)
- 8.İntrakranial abse
- 9.Nekrotizan yumuşak doku infeksiyonları
10. Osteomyelit (dirençli)
11. Geç radyasyon hasarı (yumuşak doku ve kemik nekrozu)
12. Tutması şüpheli greftler ve flepler
13. Termal yanıklar

Bunun dışında Avrupa Hiperbarik Tıp Komitesi'nin (European Committee of Hyperbaric Medicine - ECHM) 2004'te belirlediği endikasyon listesi bulunmaktadır (155). ECHM endikasyonları 3 tipe ayırmıştır. Tip 1'deki endikasyonlar HBO'nun mutlaka uygulanması önerilen hastalıklardır. Tip 2 endikasyonlar HBO uygulanmasının iyi olacağı, tip 3 endikasyonlar ise tedavinin opsiyonel olduğu hastalıkları içerir. Ayrıca tüm endikasyonlar, tedavinin yararlılığını inceleyen yayınlara göre A, B, C, D, E, F gruplarından birine dahil edilir. 1. derece kanıta dayalı öneriler derece A, 2. derece kanıta dayalı öneriler derece B, 3. derece kanıta dayalı öneriler derece C olarak kabul edilir. Sadece kontrollü olmayan çalışmalarla desteklenmiş ve konsensusun uzman görüşü olmayan durumlar derece D, fayda sağlanacağına dair kanıt bulunmayan yada yanlış yorum veya metodolojilerin sonuca varmayı engellediği durumlar derece E, HBOT kullanılmaması yönünde kanıtların bulunduğu durumlar derece F olarak verilmiştir (Tablo 4) (155).

Tablo 4. ECHM'nin Belirlediği HBO Endikasyon Listesi (155).

DURUMLAR	KABUL					
	Kanıt Derecesi					
	A	B	C	D	E	F
KUVVETLE ÖNERİLİR						
Karbonmonoksit zehirlenmesi		X				
Crush yaralanması		X				
Diş çekimi sonrası osteoradyonekrozun önlenmesinde		X				
Osteoradyonekroz (mandibula)		X				
Yumuşak doku radyonekrozları (sistit)		X				
Dekompresyon hastalığı			X			
Gaz embolisi			X			
Anaerobik ya da karışık bakteriyel anaerob infeksiyonlar			X			
ÖNERİLİR						
Diyabetik ayak lezyonları		X				
Riskli deri grefti ve muskulokutan flep			X			
Osteoradyonekroz (diğer kemikler)			X			
Radyasyon hasarına bağlı proktit / enterit			X			
Yumuşak dokunun radyasyona bağlı lezyonları			X			
İrradiye doku cerrahisi ya da implantı (koruyucu olarak)			X			
Ani işitme kaybı			X			
İskemik ülser			X			
Dirençli kronik osteomyelit			X			
Nöroblastom Evre 4			X			
İSTEĞE BAĞLI						
Post anoksik ensefalopati			X			
Larenks radyonekrozu			X			
Radyasyon hasarına bağlı merkezi sinir sistemi lezyonu			X			
Vasküler girişim sonrası reperfüzyon hasarı			X			
Uzuv reimplantasyonu			X			
> % 20 ve > 2. derece yanıklar			X			
Akut iskemik oftalmolojik hastalıklar			X			
Seçilmiş inflamatuvar sürece sekonder iyileşmeyen yaralarda			X			
Pnömotozis kistoides intestinalis			X			
DİĞER ENDİKASYONLAR						
Sternotomi sonrası mediastinit				X		
İnme				X		
Orak hücre anemisi				X		
Malign otitis eksterna				X		
Akut miyokard infarktüsü				X		
Femur başı nekrozu				X		
Retinitis pigmentosa					X	
Tinnitus					X	
İnterstisiyel sistit					X	
Fasiyal (Bell's) paralizi					X	
Serebral palsi						X
Multiple skleroz						X
Fetoplasental yetmezlik						X

2.3.4. HBO Tedavisinin Kontrendikasyonları

HBO tedavisinin kesin kontrendike olduğu tek durum, göğüs tüpü yerleştirilerek tedavi edilmemiş olan pnömotoraktır.

Diğer kontrendike olduğu durumlar ise görecelidir. Bunlar:

1. Üst solunum yolu enfeksiyonları: Otobarotravma ve sinüs sıkışmasına yol açabilir.
2. Bayılma ve bilinç kaybı nöbeti ile gelen hastalar. Ancak bu tip hastaları tedaviye alırken yine de çok dikkatli olmak gerekir. Hatta HBO tedavisi bazı durumlarda nöbeti geciktirir.
3. Akciğer grafisinde asemptomatik pulmoner lezyonun varlığı.
4. Geçirilmiş göğüs veya kulak ameliyatı hikayesinin bulunması.
5. Malignite varlığında, HBO tedavisinin, bazı hastalarda tümör oluşumunu provake ettiği, bazı hastalarda ise metastazı hızlandığı görülmüştür.
6. Hamilelik: Çeşitli hayvan deneylerinde, hamileliğin ilk dönemlerinde HBO tedavisi uygulandığında, konjenital malformasyon insidansının arttığı saptanmıştır.
7. Optik nörit: Bu durum görme bozukluğuna sebep olabileceğinden, HBO tedavisinin kontrendike olduğu haller arasındadır (156-160).

2.3.6. HBO Tedavisi Alan Hastalarda Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

İnsan vücudunun hava dolu boşlukları olan orta kulak ve sinüslerdeki gazlar sıkıştırılabilir nitelikte olduklarından basınç değişikliklerinden etkilenirler. HBO tedavi odasına girenlerde en sık rastlanan problemlerin başında orta kulak ve paranasal sinüs şikayetleri gelir (BAROTRAVMA). Hastalara eşitleme eğitimi verilmelidir (161).

Vazokonstriktör burun damlaları, HBO tedavisi sırasında oluşan problemleri azaltmada yardımcı olur. Üst solunum yolu enfeksiyonları bu eşitleme işlemindeki zorlukları artırır. Böyle durumda olan hastalar kulak

burun boğaz tedavisi olmadan tedavi odasına alınmamalıdır veya bilinçsiz hastalarda timpan zarının perforasyonunu önlemek için iki taraflı myringotomi ve ventilasyon tüpü yerleştirilmesi uygulanmalıdır (162).

Boyle Yasası'na uygun olarak genişleyen solunum gazları alveoler gerilme ve yırtılmaya neden olur. Yırtılma sonucu pnömomediastinum, pnömotoraks veya gaz embolisi gelişir. Böyle bir tehlikeden korunmak için hasta tedavi odası içinde iyi gözlenmeli ve daha önceden akciğerlere ait hastalık olup olmadığı belirlenmelidir. Hasta hikayesinin tam alınmadığı durumda dekompresyon hızı çok yavaş ayarlanmalıdır. Endotrakeal tüp ve buna benzer balonlu aletler iyi gözlenmelidir. Atmosferik basınçta şişirilmiş balonlar, HBO sırasında hacimleri küçüleceğinden hipoventilasyona yol açar. Buna karşılık, dekompresyon sırasında balon hacmi genişlemesi trakea yırtılmalarına yol açar. Bu nedenle, balonların istenilen basınçta kalmaları sağlanmalıdır. Bu etkiler, balonlara hava yerine fizyolojik serum doldurmakla önlenabilir (163).

Günümüze dek yapılan çalışma ve sonuçları HBO'nun birçok hastalığın tedavisinde yer alabileceğini göstermektedir. Çeşitli tedavi protokolleri yaygın şekilde kullanılarak geniş kabul görmüştür. Tedavi sonuçları ve başarı yüzdeleri üzerine yapılmış çalışmalara göre HBO'nun hangi hastalıklarda tedaviye ne oranda katılabileceği saptanmıştır ve günümüze kadar gelişerek 150' nin üzerinde farklı klinik tabloda denenmiştir.

2.3.7. Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Uygulanması

HBO tedavisi, tek veya çok kişiyi içine alan kabinlerde, %100 O₂'nin direkt solunarak, endotrakeal tüp, maske veya sıkı bir başlık yardımı ile solutulması ile yapılabilir. Tedavi süresi tek seans için 45 dakika (CO zehirlenmesi) ile 5 saat (ciddi dekompresyon hastalığı) arasında değişir. Debridman ve antibiyoterapiye yanıt vermeyen problem yaralarda tedavi protokolü, ortalama 90 dakika süren 20-30 seans olarak düzenlenir. Tedavi sırasında yoğun bakım monitorizasyonu ve tedavisini sağlayacak şartlar (mekanik ventilatör dahil) hazır tutulmalıdır.

III. MATERYAL – METOD

Araştırmamızın yöntemi; tek taraflı üreter obstrüksiyonu ile böbrekte oluşturulmak istenen iskemik nefropatiyi histolojik bulgular, NOS ve caspase aktivitesi ve apoptozis ile ortaya koymak ve HBO tedavisinin etki mekanizmasını bu parametreler üzerinden açıklamaktır.

Bu çalışmanın cerrahi işlem bölümü Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarları'nda, hiperbarik oksijen tedavisi, Neoks Hiperbarik Oksijen Tedavi Merkezi'nde uygulandı. Mikroskopik incelemeleri Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmada kullanılan deney hayvanlarına uygulanan tüm işlemlerde etik kurallar dikkate alındı. (DEÜ Deney Hayvanları Etik Kurulu Protokol No: 02/2009)

3.1. DENEY HAYVANLARI

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarları'nda üretilmiş; dört grupta, yedişer adet olmak üzere toplam 28 adet Spraque-Dawley cinsi rat kullanıldı. Her gruptaki 12 – 20 haftalık erişkin ratların ağırlıkları 200-250 gram arasında değişmekteydi. Ratlar deney sonuna kadar 3 ve 4'erli kafeslerde, 22±3C° oda ısısında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ışık koşullarında tutuldu. Hayvanların beslenmesinde standart pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı.

3.2. DENEY GRUPLARI

Çalışmamızda kullanılan dört grubun özellikleri Tablo 5' de sıralanmıştır:

Tablo 5: Deney Grupları

Deney ve Kontrol grupları	Grup başına hayvan adedi
Grup 1 (Kontrol grubu)	7
Grup 2 (Cerrahi Sham grubu)	7
Grup 3 (Obstrüksiyon Grubu)	7
Grup 4 (Obstrüksiyon + HBO Tedavi Grubu)	7
Kullanılan toplam hayvan sayısı	28

Grup 1 (Kontrol grubu): 10 gün süre ile günde 2 kez HBO tedavisi alan grup.

Grup 2 (Cerrahi Sham grubu): Sol orta hat abdominal insizyonu ile laparotomi yapılarak karın boşluğuna girildi, sol üretere ulaşıldı. Üreter mobilize edildi. Hiçbir işlem uygulanmadan, laparotomi kesileri atravmatik 4/0 ipek dikişle kapatılarak ratlar kafeslerine alındı. 10 gün süreyle normal şartlarda beslendi.

Grup 3 (Obstrüksiyon Grubu): Sol orta hat abdominal insizyonu ile laparotomi yapılarak karın boşluğuna girildi, sol üretere ulaşıldı, üreter 5/0 serbest ipekle bağlanarak, üreterin 2/3 proksimalinde tam tıkanıklık oluşturuldu. Laparotomi kesileri atravmatik 4/0 ipek dikişle kapatılarak ratlar kafeslerine alındı. 10 gün süreyle normal şartlarda beslendi.

Grup 4 (Obstrüksiyon + HBO Tedavi Grubu) : Sol orta hat abdominal insizyonu ile laparotomi yapılarak karın boşluğuna girildi, sol üretere ulaşıldı, üreter 5/0 serbest ipekle bağlanarak, üreterin 2/3 proksimalinde tam tıkanıklık oluşturuldu. Laparotomi kesileri atravmatik 4/0 ipek dikişle kapatılarak ratlar kafeslerine alındı. Ratlara 10 gün süre ile günde 2 kez HBO tedavisi uygulandı.

3.3. ANESTEZİ

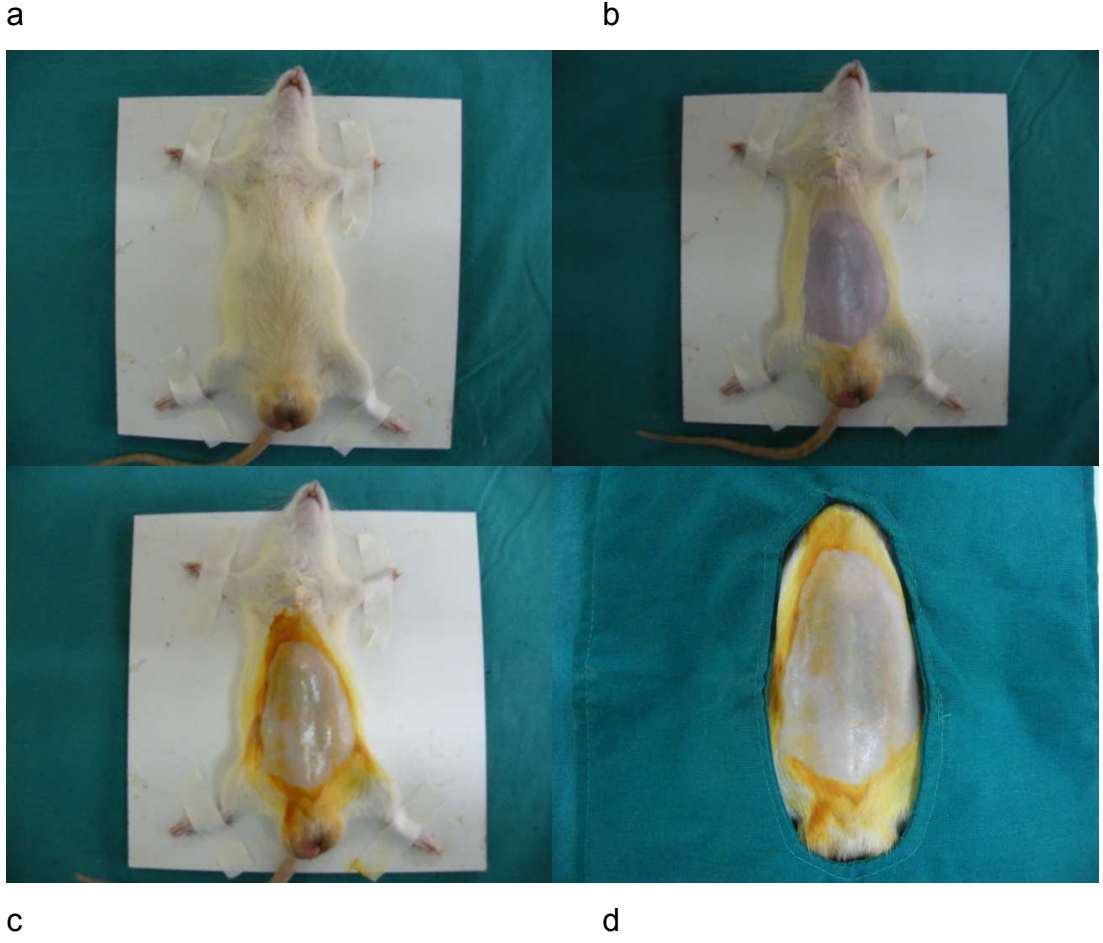
Cerrahi işlem yapılacak olan tüm gruptaki sıçanlara genel anestezi amaçlı 2 mgr/kg ketamin HCl (Ketalar, Parke-Davis Eczacıbaşı-İstanbul) + ksilazin intraperitoneal verilerek sedasyon sağlandı.

3.4. CERRAHİ İŞLEM

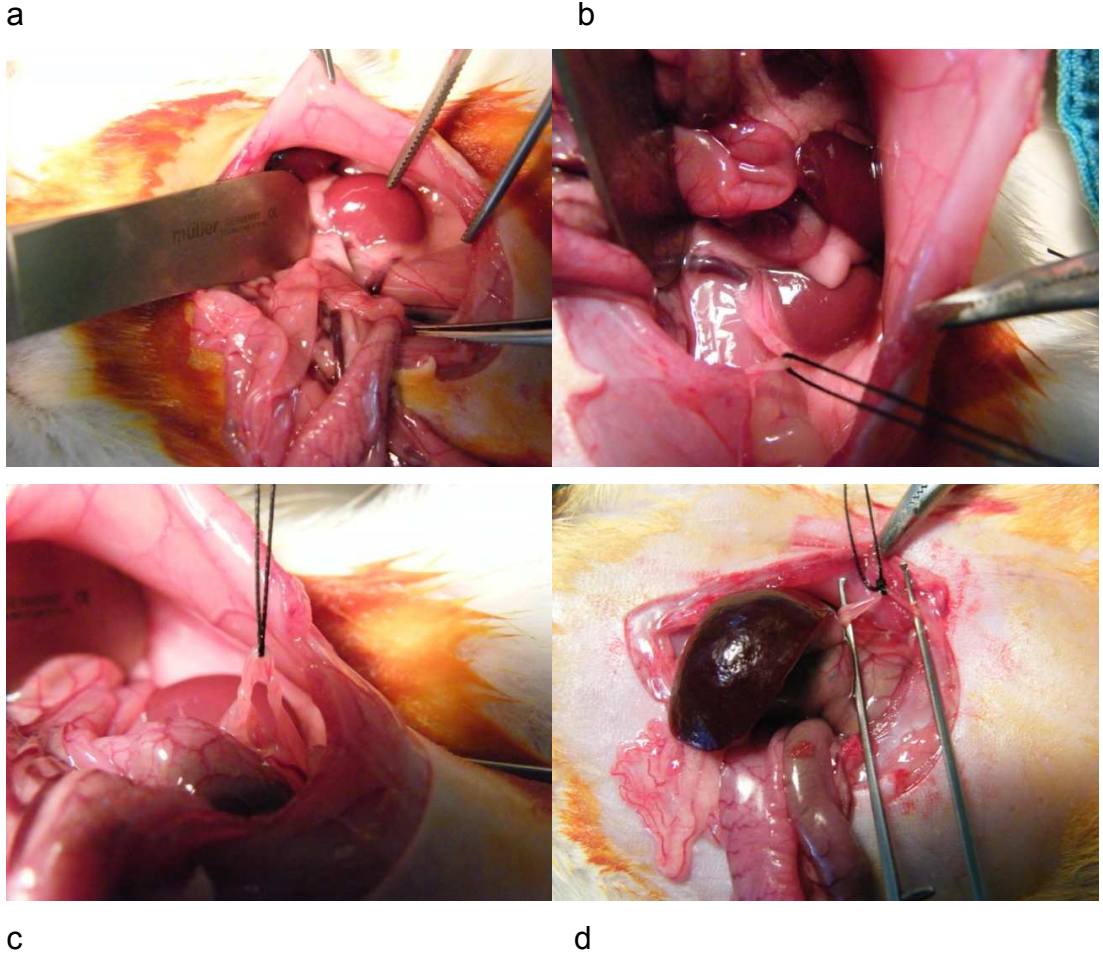
Sıçanlar tespit tahtalarına supine pozisyonunda yerleştirildi. Karın ön duvarı cildi önce PVD iyodin (Batticon st solüsyon Adeka-Samsun) ile sterilize edildikten sonra tıraşlandı. Cilt traşından sonra tekrar PVD iyodin ile sterilizasyon sağlandı. Yalnızca insizyon uygulanacak saha açık kalacak şekilde steril olarak örtülerek, steril aletler kullanılarak sol midline abdominal insizyon uygulandı.

Çalışma bitiminde, 11. günde ratlara anestezi/ tranklizan altında laparotomi ve sol nefrektomi yapıldı. Sol nefrektomi sonrasında ratların kan kaybından ölmesi sağlandı. Bütün olarak çıkarılan sol böbrekler serum fizyolojik ile yıkanarak yüzeysel temizlikleri yapıldı. Sol böbreklerden alınan doku örnekleri %10' luk formalin içinde histopatolojik incelemeler için tespit edildi.

Şekil 2: Ratların hazırlanması



Ratın supin pozisyonda tespiti (a), cildin traşlanması (b), Batticon solüsyonuyla boyanması (c) ve örtülmesi (d).



Şekil 3: Sol böbreğin bulunması (a), sol üreterin diseksiyonu (b,c) ve bağlanması (d)



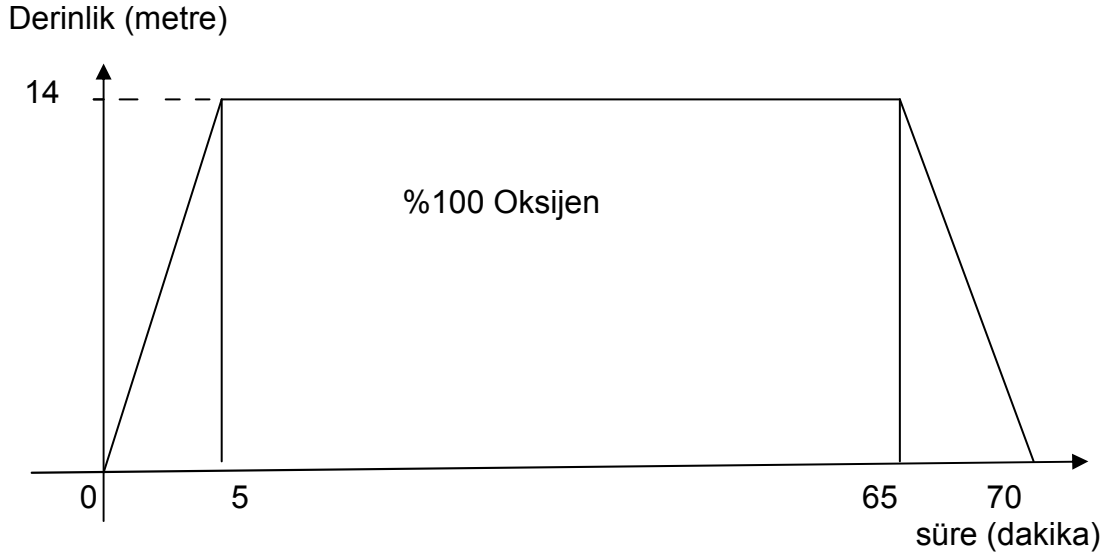
Şekil 4: Laparatominin anatomiye uygun kapatılması

3.5. HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ

Tedavi, operasyonun hemen ardından 1. saatte başlatıldı ve günde 2 kez olacak şekilde 10 gün süre ile uygulandı. 20 seans sonunda tedavi sonlandırılarak hayvanlar sakrifiye edildi. Tedaviler 2.4 ATA basınçta ve her biri 70 dakika sürecektir olan seanslar halinde uygulandı. Tedavi öncesinde kabin 5 dakika süre ile %100 oksijen ile yıkandı, ardından 5 dakikada istenen tedavi derinliğine ulaşıldı. 2.4 atmosfer basınçta 60 dakika süre ile tedavi uygulandı, dekompresyon ise 5 dakikada sağlandı. Toplam 70 dakikada tedavi sonlanmış oldu (Şekil 6).

Hiperbarik oksijen tedavisi deney hayvanları için özel olarak yapılmış Barotech Ltd marka B2 model monoplace basınç odası içinde gerçekleştirildi (Şekil 7).

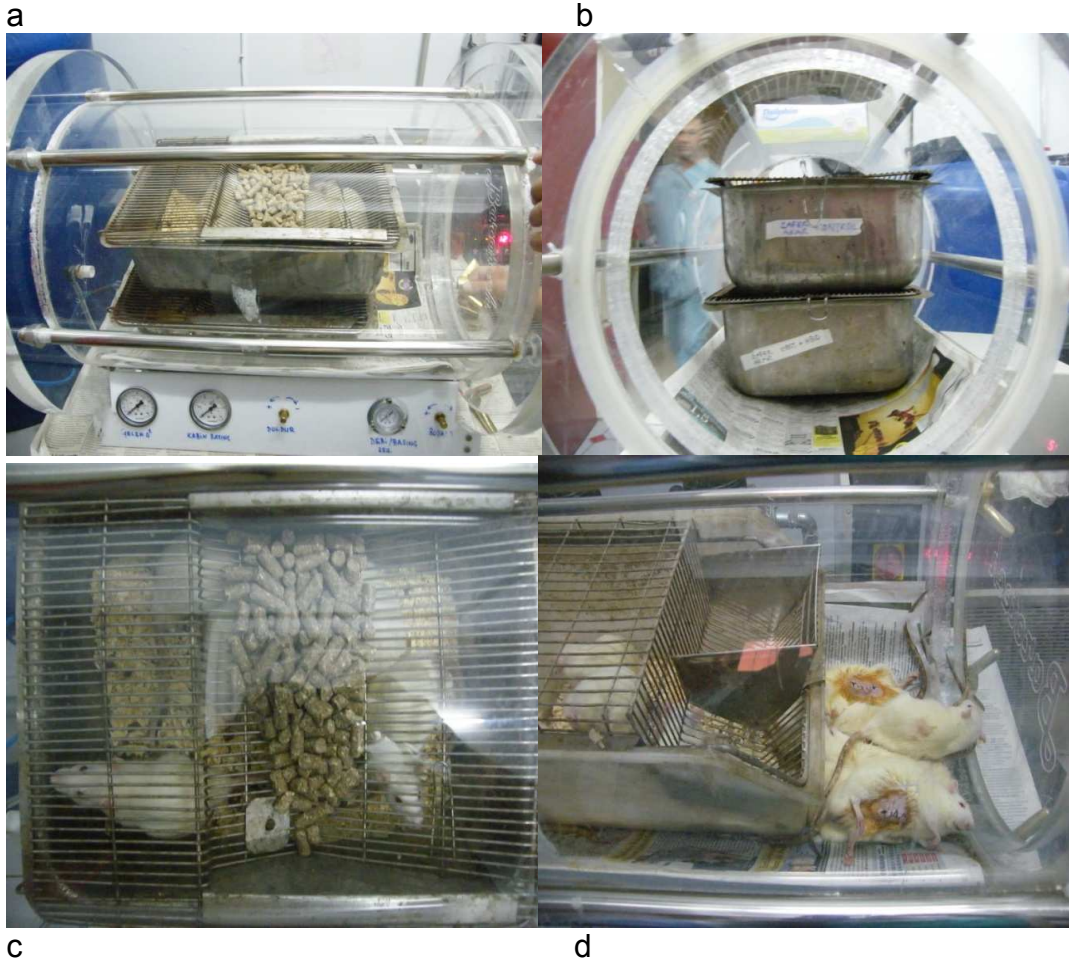
Şekil 6: HBO Tedavi Şeması



Basınç Odası Barotech Ltd. marka (2009) DB1 model Ar-Ge basınç odası olup teknik özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

- Çalışma basıncı: 2.6 Bar, 3.6 ATA,
- Test basıncı: 4 ATA,
- İç çap: 40 cm
- Toplam uzunluk: 55 cm,
- Kapı çapı: 46 cm,
- Malzeme: pleksiglass maddesinden yapılmıştır. Bütünüyle şeffaf olup net hacmi 70 lt.dir.
- Basınç göstergeleri: Hat basıncı ve basınç odası göstergesi olmak üzere iki adet olup güvenlik regülatörü bulunmaktadır.

Şekil 7: HBO Uygulaması



a,b,c: İki gruba ait ratlar iki ayrı kafeste tedaviye alındı.

d: Post-op ilk doz, opere ratlar henüz anestezi etkisinde iken verildi.

3.6. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Tüm gruplara ait deneklerin böbrek dokuları çıkartıldıktan sonra ölmeleri sağlandı. (Şekil 8) Dokular %10 formalin solüsyonu içerisinde 24-48 saat tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemi uygulandı. Parafin bloklardan elde edilen kesitler histomorfolojik inceleme için histokimyasal, e-NOS, i-NOS ve kaspaz-3 dağılımı için immunohistokimyasal ve apoptotik hücrelerin tespiti için TUNEL boyamaları için kullanıldı. Histokimyasal inceleme için kesitler rutin protokoller uygulanarak hematoxilen-eozin ile

boyandı. İmmunohistokimyasal inceleme için ise kesitler rutin boyama protokolü uygulandıktan sonra anti-eNOS, anti-iNOS ve anti-kaspaz-3 antikorları ile indirekt immunohistokimyasal boyama yöntemi kullanıldı. TUNEL yöntemi için ise kesitler rutin boyama protokolü uygulandıktan sonra tdt uygulaması yapılarak apoptotik hücrelerin boyanması sağlandı.

Şekil 8: Çıkarılan böbrek dokularının makroskopik görünüşleri



a: Sağ ve sol böbrekler , b: sağ böbrek kalisiyel yapılar ,
c,d: solda genişlemiş kaliksler

3.6.1. Parafin Doku Takibi

Tespit edilen deri örnekleri, fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 30'ar dakika %60'dan %80' e artan etil alkol serilerinden geçirildi. %95 alkol içerisinde 1'er saat iki değişim sağlanarak tutulan örnekler 30 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 1'er saat iki değişim ksilene tabi tutuldu. 1:1 ksilen:parafin içerisinde 30 dakika 60° C' lik etüvde tutulan örnekler bir saat 2 değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra blok kaplarına alınarak parafin içerisinde gömüldü (Tablo 6). Alınan 5 µ'luk kesitler histokimyasal inceleme için hematoksilen-eozin, immunohistokimyasal inceleme için indirekt immunoperaksidaz boyaması yapıldı.

Tablo 6: Parafin doku takibi

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin,	24 saat-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 60 etil alkol	30 dk
	% 70 etil alkol	30 dk
	% 80 etil alkol	30 dk
	% 95 etil alkol	1 saat
	% 95 etil alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen – Alkol	30 dk
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
Emdirme %60 C etüv	Ksilen parafin	30 dk
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

3.6.2. Hematoksilen- Eozin Boyaması

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm' lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95' den %60' a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 30 dk. boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dk. akar suda yıkandı. Daha sonra kesitler 2 dk. eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dk. akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95' lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 7).

Tablo 7: Hematoksilen-Eozin Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	30 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	2 dakika

Yıkama	Akar su	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 alkol	1 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

3.6.3. TUNEL Boyaması

Bu teknik için Dead-End Colorimetric TUNEL system kiti (Trevigen Insitu Detection Kit, Cat. No: 4810-30-K) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60°C' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dk. iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak fosfat tampon solüsyonunda (PBS: Posphate buffer solution) 5 dk yıkandı. Daha sonra oda sıcaklığında 15 dk 20 µg/ml proteinase K ile inkübe edilen kesitler 3 defa 5' er dk PBS ile yıkandı. Endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ (TA-015-HP, Lab vision, Fremont, CA) uygulanan kesitler PBS ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkandı. Equilibration tampon solusyonu ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilen kesitler, TdT enzimi ile 37 °C de 1 saat bekletildi. Kontrol boyama kesitleri TdT enzimi konmayıp, sadece reaksiyon solusyonunda bekletildi. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında 10 dakika tampon solüsyonu ile, 3 defa 5'er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı. Anti-digoxigenin konjugat solüsyonu ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen kesitler 4 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. TUNEL reaksiyonun görünurlüğünü saptamak amacı ile kesitler 5 dakika diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlanan kesitler %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30 dk ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. TUNEL pozitif hücre sayımı iki histolog tarafından ayrı zamanlarda Image-Pro Plus 5.1.2 hücre sayım programında her gruptan her bir denkten alınan kesitlerde en az 5 farklı alanda boyalı ve boyanmayan hücreler belirlenerek sayım yapıldı (Tablo 8).

Tablo 8: TUNEL Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Proteinaz K solusyonu	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	% 3'lük hidrojen peroksit	5 dk
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Tamponlama	Equilibration tampon sol.	5 dk
Primer antikor	Enzim solusyonu	37°De 1 saat
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Anti-digoxigenin konjugat	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB boyası	10 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt boyama	Mayer hematoksilen	4 dakika
Dehidratasyon	%80-%90'lık alkol serileri	2 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.4. İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi

Alınan böbrek kesitleri immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 C°' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95' ten %60' a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. İşaretleyici kalem (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3' lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitler 10 dakika bloklama solusyonu (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile muamele edidi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar anti-e-NOS (Genetex Cat. No:GTX15280), anti-i-NOS (Genetex Cat No: GTX15323) ve anti-kaspaz-3 (Genetex Cat. No:GTX73090) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikor (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA SKU#:85-9043) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA Spring Bioscience Cat. No:DAB-125) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland ScyTek Ref: HMM999) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyum (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı (Tablo 9).

İndirekt immunohistokimya işleminden sonra örnekler iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirilerek, immunoreaktiviteler negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 9: İndirek immunohistokimya boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	10 dakika
	%3' lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	10 dakika
Antikor ile inkübasyon	e-NOS, i-NOS, kaspaz-3	1 gece, 4°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dk
Yıkama	Distile su	15 dakika
Zıt Boyama	Mayer hematoksilen	15 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Kapama	Kapatma mediumu	

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin analizi SPSS 11.5 paket programında gösterildi. Tanımlayıcı istatistikler histopatoloji sonuçlarındaki değişim ortanca (minimum-maksimum) biçiminde gösterildi. İmmunohistokimyasal ve TUNEL yöntemleri Image Pro-Plus 5.1 analiz programı ile değerlendirilerek elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlılığı Kruskal Wallis testiyle incelendi. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. BULGULAR

4.1. Böbrek Dokusu Histokimyasal Sonuçları

Böbrek dokuları histolojik açıdan değerlendirildiğinde;

1. Hematoksilen-eozin ile yapılan tüm gruplara ait kesitlerde, korteks ve medulla ayrımı kolaylıkla yapılabiliyordu.
2. Kontrol ve sham gruplarına ait örneklerde böbrek dokusu normal olarak değerlendirildi.
3. Obstrüksiyon uygulanan grupta, glomerül yapıları normal iken, proksimal ve distal tubuluslarda ödem, konjesyon ve yer yer piknotik çekirdekli hücrelere rastlandı. Bununla beraber tubuluslarda dilatasyon da izlendi. Henle kulbunun inen, çıkan ve ince kısımlarında ve toplayıcı kanallarda yer yer piknotik çekirdekli hücreler gözlemlendi.
4. Tedavi uygulanan grupta ise; obstrüksiyon grubuna benzer özellikte bulgulara rastlandı. Glomerüler yapılar korunurken, tubuluslarda ödem, şişme ve piknotik çekirdekli hücrelere rastlandı (Tablo 12).

4.2. İmmunohistokimya Sonuçları

İmmunohistokimyasal boyanmaların intensiteleri boyanmanın özelliğine göre negatif (-), çok zayıf ($\pm$), zayıf (+), orta şiddette (++) ve kuvvetli (+++) olarak değerlendirildi. İntensite dağılımları aynı denek içinde dokular arasında farklılık göstermesi üzerine immunohistokimya değerlendirilmesinde HSCORE analiz yöntemi kullanıldı.

Burada kullanılan formülde; $HSCORE = \sum P_i (i+1)$

i = intensite derecesini (yukarıda tarif edildiği gibi), P_i değeri ise boyanan hücre sayısını belirtmektedir.

4.2.1. e-NOS dağılımı

İmmunohistokimyasal analiz sonucunda e-NOS immunoreaktivitesinin tüm gruplarda gözlemlendiği saptandı.

1. Kontrol grubunda e-NOS immunoreaktivitesi kortekste çok zayıf, yer yer zayıf şiddette olduğu, medullada ise zayıf şiddette olduğu gözlemlendi.
2. Sham grubunda ise e-NOS immunoreaktivitesinin kortekste zayıf şiddette olduğu, medullada ise çok zayıf veya zayıf şiddette olduğu izlendi,
3. Obstrüktif grupta immunoreaktivitenin hem kortekste hem de medullada kontrol ve sham grubuna oranla arttığı gözlemlendi.
4. Tedavi grubunda ise e-NOS immunoreaktivitesinin zayıf şiddette olduğu ve obstrüksiyon grubuna oranla azaldığı izlendi.

4.2.2. i-NOS dağılımı

i-NOS immunoreaktivitesinin tüm gruplarda gözlemlendiği ve tüm gruplarda e-NOS immunoreaktivitesine oranla daha fazla olduğu saptandı.

1. Kontrol grubunda hem korteks hem de medullada zayıf şiddette olduğu gözlemlendi,
2. Sham grubunda hem korteks hemde medullada zayıf yer yer ise orta şiddette olduğu izlendi.
3. Obstrüksiyon uygulanan grupta ise i-NOS immunoreaktivitesinin hem korteks hemde medullada orta şiddette yer yer ise kuvvetli olduğu saptandı,
4. Tedavi uygulanan grupta i-NOS immunoreaktivitesinin obstrüksiyon grubuna oranla azaldığı ve hem korteks hem de medullada orta şiddette olduğu gözlemlendi.

4.3. TUNEL Boyama Sonuçları

TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) boyaması ile yapılan apoptotik hücrelerin belirlenmesi çalışmasında; TUNEL pozitif hücreler, kahverengi çekirdekli apoptotik hücreler olarak belirlendikten sonra, her bir denekte 5 farklı alanda 100 hücre sayıldı. Elde edilen veriler % olarak belirtildi.

1. Kontrol ve sham grubunda TUNEL pozitif hücrelerin sayılarının sırasıyla kortekste 0.33 ± 0.50 ve 1.56 ± 1.01 , medullada ise 1.89 ± 1.45 ve 4.56 ± 1.24 olduğu saptandı. İstatistiksel olarak inceleme sonucunda ise kontrol ve sham gruplarının korteks ve medulladaki apoptotik hücre sayılarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi ($P>0.05$).
2. Obstrüksiyon uygulanan grupta ise apoptotik hücre sayısının kortekste 6.67 ± 1.73 , medullada ise 10.33 ± 3.43 olduğu izlendi.
3. Tedavi uygulanan grupta apoptotik hücre sayılarının obstrüktif gruptan daha az olduğu ve kortekste: 3.34 ± 1.32 , medullada: 5.78 ± 2.39 olduğu izlendi. Veriler obstrüksiyon uygulanan grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (Kortekste $P<0.01$, Medullada $P<0.001$).
4. Tedavi grubundaki apoptotik hücre sayılarının kontrol grubundan daha fazla olduğu (Kortekte $P<0.05$, Medullada $P<0.001$) fakat tedavi grubunun korteksdeki apoptotik hücre sayısının sham grubu ile benzer olduğu gözlemlendi ($P>0.05$).

4.4. Kaspaz-3 dağılımı

Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin kontrol grubunda negatif iken, sham grubunda çok zayıf şiddette gözlemlendi ($P>0.05$). Bununla beraber obstrüksiyon grubunda kaspaz-3 immunoreaktivitesini korteks ve medullada zayıf şiddette gözlenir iken, tedavi grubunda immunoreaktivitenin azaldığı ve çok zayıf şiddette olduğu bulundu. Ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). Obstrüksiyon grubu kontrol ve sham grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir kaspase 3 artışı saptandı (Kontrol-Obstrüksiyon $P<0.001$, Sham-Obstrüksiyon $P<0.05$)

İmmunohistokimyasal tekniğin kontrol boyama grubunda ise immunoreaktivitelerin negatif olması immunoreaktivitelerin spesifik olduğunu göstermektedir.

Tablo 10 : HSCORE Değerleri (Veriler Mean $\pm$ SD)

Gruplar		e-NOS	i-NOS	Kaspaz-3	TUNEL
I.	K*	6.1 $\pm$ 2.69	12.8 $\pm$ 3.26	0	0.33 $\pm$ 0.50
	M**	3.00 $\pm$ 0.67	14.00 $\pm$ 3.77	0	1.89 $\pm$ 1.45
II.	K	16.8 $\pm$ 3.30	27.4 $\pm$ 6.11	2.1 $\pm$ 0.88	1.56 $\pm$ 1.01
	M	12.00 $\pm$ 2.11	20.9 $\pm$ 7.40	4 $\pm$ 1.05	4.56 $\pm$ 1.24
III.	K	33.5 $\pm$ 3.36	61.1 $\pm$ 6.76	10.1 $\pm$ 3.29	6.67 $\pm$ 1.73
	M	20.6 $\pm$ 1.90	113.6 $\pm$ 14.17	11.7 $\pm$ 2.83	10.33 $\pm$ 3.43
IV.	K	15.8 $\pm$ 2.20	53.4 $\pm$ 5.88	3.3 $\pm$ 0.95	3.34 $\pm$ 1.32
	M	10.00 $\pm$ 1.89	76.2 $\pm$ 5.93	5.8 $\pm$ 1.61	5.78 $\pm$ 2.39
Kontrol		Boyanma	Boyanma	Boyanma	Boyanma
Boyama		YOK	YOK	YOK	YOK

K*: Korteks, M**: Medulla

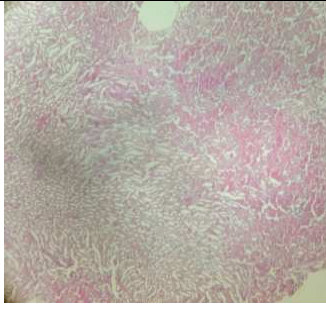
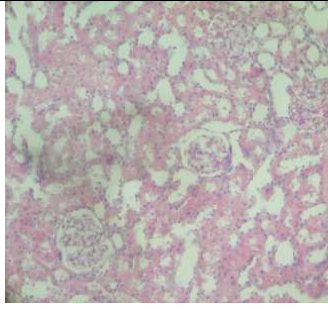
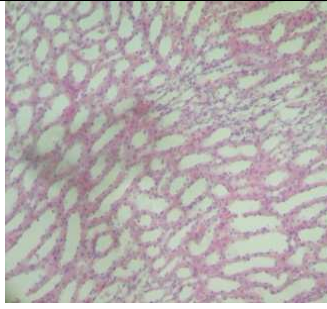
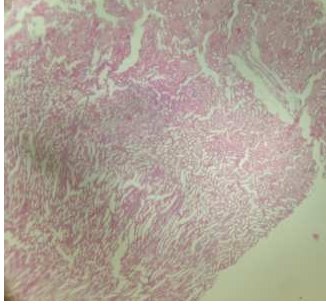
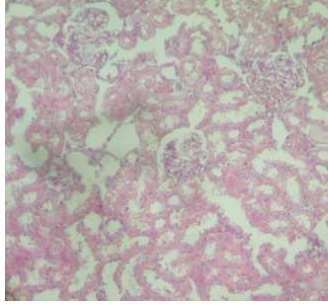
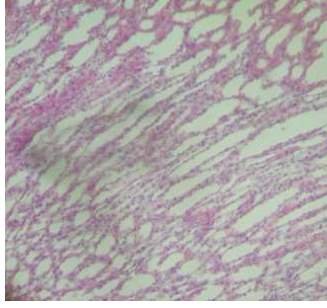
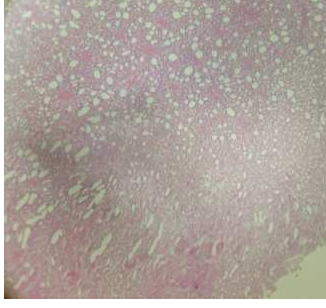
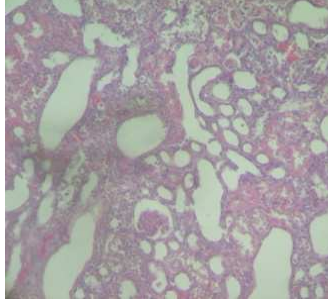
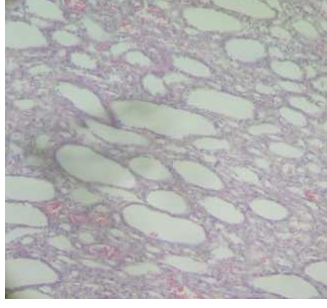
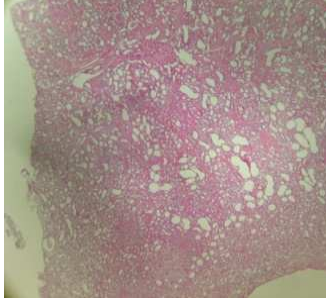
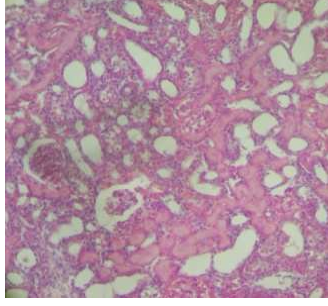
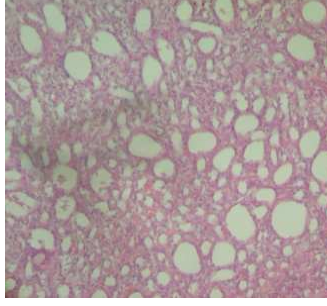
Tablo 11: Böbrek Korteksine Ait Tüm Grupların Birbiriyle Karşılaştırmalı İstatistiksel Sonuçları ve p değerleri.

KORTEKS							
GRUP	e-NOS		i-NOS		CASPACE 3		TUNEL
1.	6.1±2.69		12.8± 3.26		0		0.33±0.50
2.	16.8±3.30	P<0.001	27.4 ± 6.11	P<0.001	2.1±0.88	P>0.05	1.56±1.01 P>0.05
1.	6.1±2.69		12.8±3.26		0		0.33±0.50
3.	33.5±3.36	P<0.001	61.1±6.76	P<0.001	10.1±3.29	P<0.001	6.67±1.73 P<0.001
1.	6.1±2.69		12.8±3.26		0		0.33±0.50
4.	15.8±2.20	P<0.01	53.4±5.88	P<0.001	3.3±0.95	P>0.05	3.34±1.32 P<0.05
2.	16.8±3.30		27.4±6.11		2.1±0.88		1.56±1.01
3.	33.5±3.36	P<0.001	61.1±6.76	P<0.001	10.1±3.29	P<0.05	6.67±1.73 P<0.001
2.	16.8±3.30		27.4±6.11		2.1±0.88		1.56±1.01
4.	15.8± 2.20	P>0.05	53.4±5.88	P<0.001	3.3 ± 0.95	P>0.05	3.34±1.32 P>0.05
3.	33.5±3.36		61.1±6.76		10.1±3.29		6.67±1.73
4.	15.8±2.20	P<0.001	53.4±5.88	P<0.05	3.3±0.95	P>0.05	3.34±1.32 P<0.01

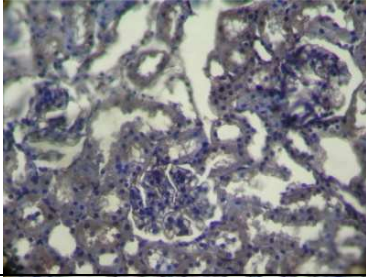
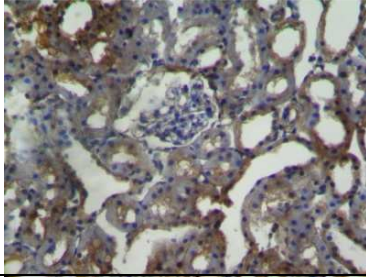
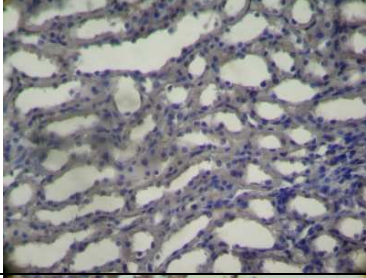
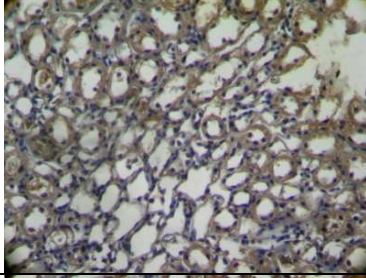
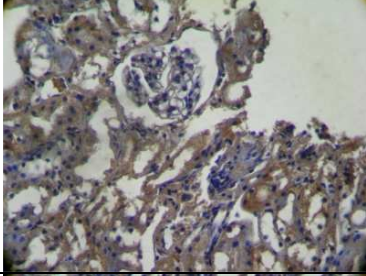
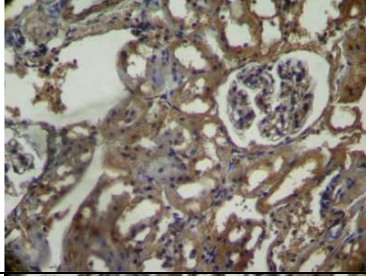
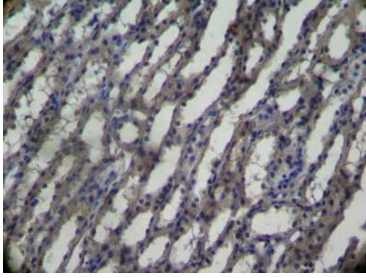
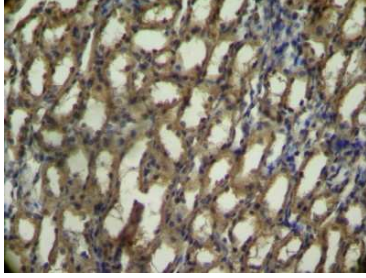
Tablo 12: Böbrek Medullasına Ait Tüm Grupların Birbiriyle Karşılaştırmalı İstatistiksel Sonuçları ve p Değerleri.

MEDULLA									
GRUP		e-NOS		i-NOS		CASPASE 3		TUNEL	
1.		3.00 ± 0.67		14.00±3.77		0		1.89± 1.45	
2.		12.00±2.11	P<0.01	20.9±7.40	P>0.05	4±1.05	P>0.05	4.56± 1.24	P>0.05
1.		3.00 ± 0.67		14.00±3.77		0		1.89± 1.45	
3.		20.6 ± 1.90	P<0.001	113.6±14.17	P<0.001	11.7±2.83	P<0.001	10.33±3.43	P<0.001
1.		3.00 ± 0.67		14.00±3.77		0		1.89 ± 1.45	
4.		10.00±1.89	P>0.05	76.2±5.93	P<0.001	5.8± 1.61	P>0.05	5.78 ± 2.39	P<0.001
2.		12.00±2.11		20.9±7.40		4± 1.05		4.56 ± 1.24	
3.		20.6 ± 1.90	P<0.01	113.6±14.17	P<0.001	11.7± 2.83	P<0.05	10.33±3.43	P<0.001
2.		12.00±2.11		20.9±7.40		4± 1.05		4.56 ± 1.24	
4.		10.00±1.89	P>0.05	76.2 ± 5.93	P<0.001	5.8± 1.61	P>0.05	5.78 ± 2.39	P>0.05
3.		20.6 ± 1.90		113.6±14.17		11.7± 2.83		10.33±3.43	
4.		10.00±1.89	P<0.001	76.2±5.93	P<0.001	5.8± 1.61	P>0.05	5.78 ± 2.39	P<0.001

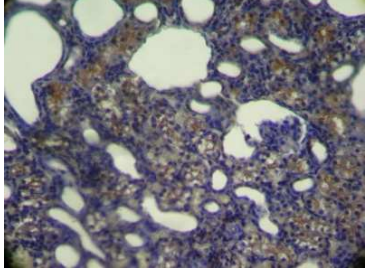
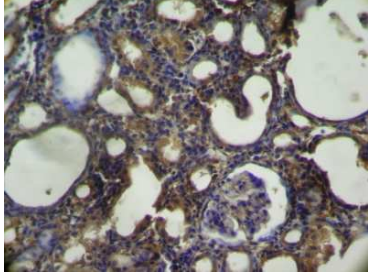
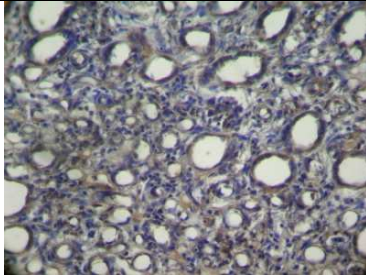
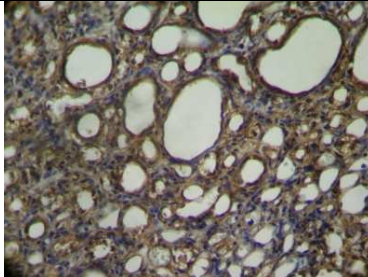
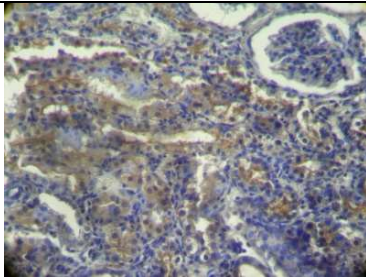
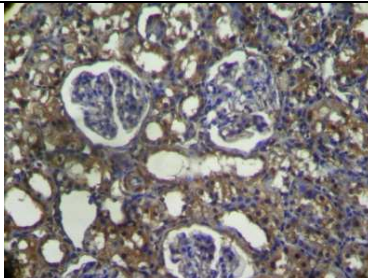
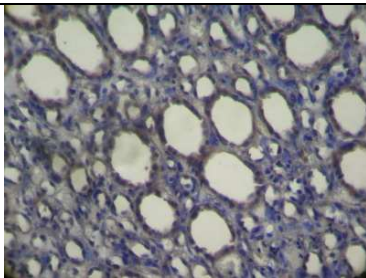
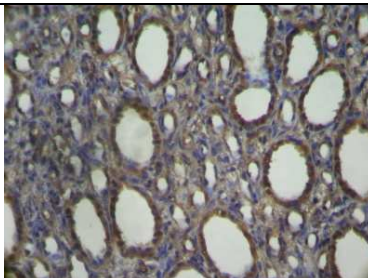
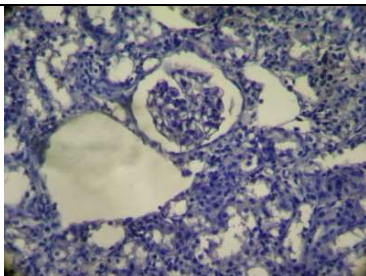
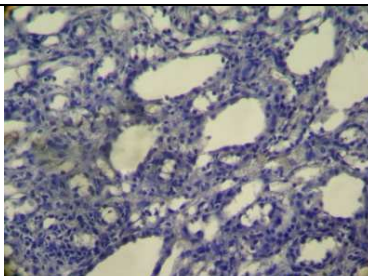
Tablo 13: Hematoksilen –Eozin Boyası

G	X40	X200 Korteks	X200 Medulla
I.			
II.			
III.			
IV.			

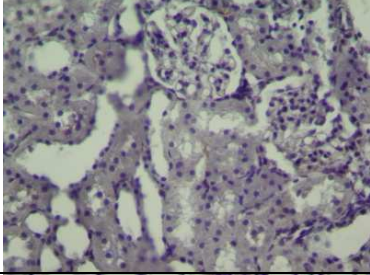
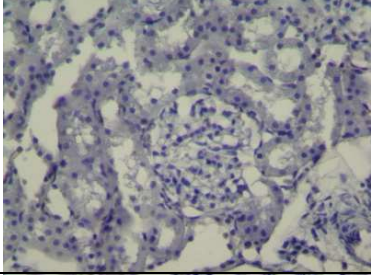
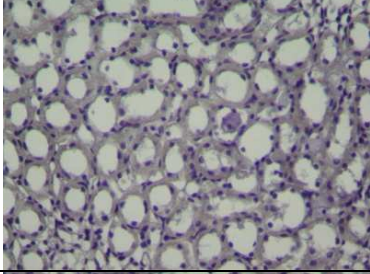
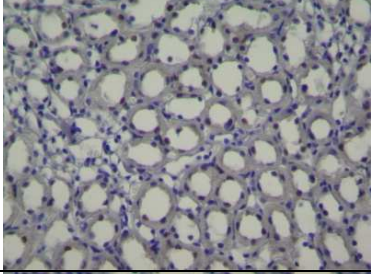
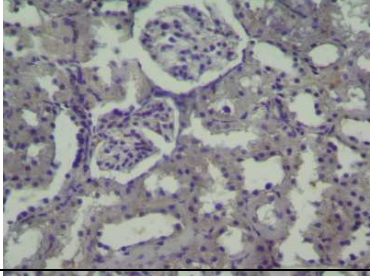
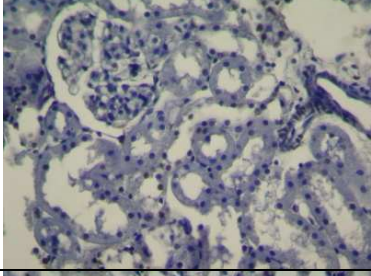
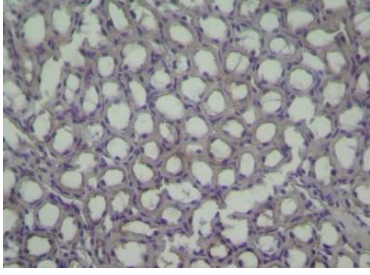
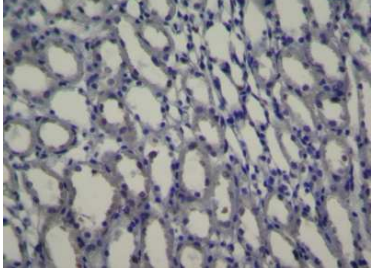
Tablo14: e-NOS ve i-NOS İmmunoreaktivitesine Ait Resimler

G		e-NOS	i-NOS
I.	K		
	M		
II.	K		
	M		

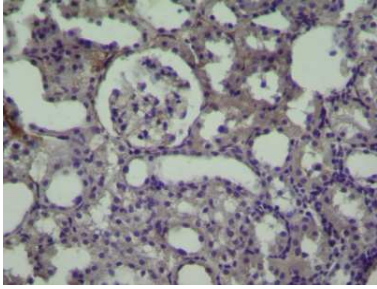
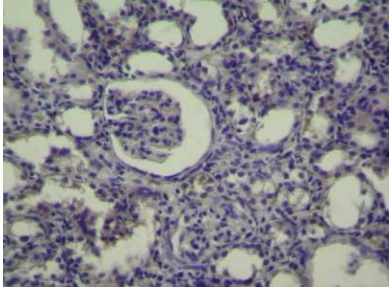
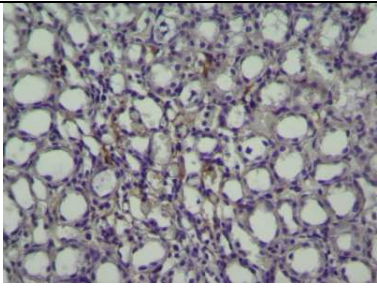
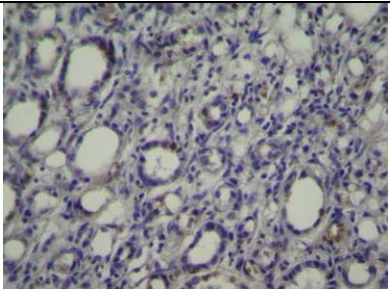
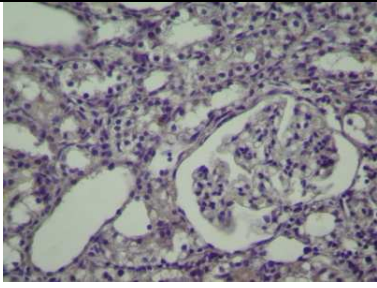
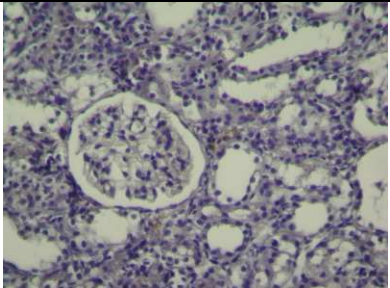
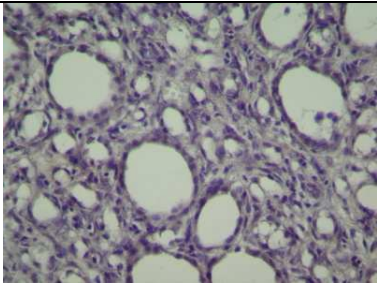
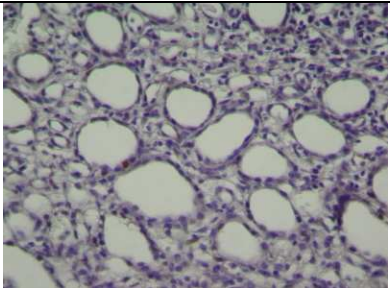
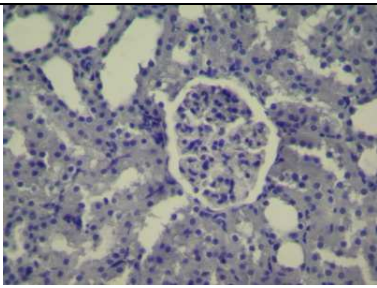
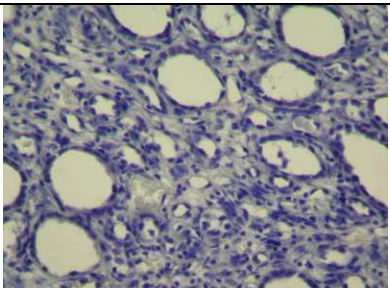
Tablo 14'ün devamı

III.	K		
	M		
IV.	K		
	M		
Kontrol Boyama			

Tablo 15: Kaspaz-3 dağılımı veTUNEL pozitif hücrelere ait resimler

G		KASPASE 3	TUNNEL
I.	K		
	M		
II.	K		
	M		

Tablo 15'in devamı

III.	K		
	M		
IV.	K		
	M		
Kontrol Boyama			

4.5. Histolojik Değerlendirme Sonuçları

Obstrüksiyon uygulanan grupta histolojik değişikliklerin gözlenmesi kronik obstrüksiyon varlığını gösterirken, apoptotik hücrelerin özellikle obstrüksiyon grubunda fazla olması hücre hasarının varlığını desteklemektedir. Bununla birlikte HBO tedavisi ile histolojik olarak farklılık gözlenmez iken, moleküler düzeyde apoptotik hücre sayısının bir miktar azaldığı saptanmıştır.

Obstrüksiyon ile böbrek dokusunda hem e-NOS hem de i-NOS immunoreaktivitelerinin kontrol ve sham gruplarına oranla daha fazla olduğunun gözlenmesi doku hasarı ile birlikte e-NOS ve özellikle de i-NOS salgısında artış olduğunu desteklemektedir. HBO tedavisi sonrası moleküler açıdan dokuda e-NOS, i-NOS immunoreaktivitelerinde azalmanın gözlenmesi ile HBO'nun doku hasarına karşı koruyucu etkisinin bu moleküllerin salgısını azaltarak da sağlayabildiği düşünüldü.

Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin beklenenin aksine obstrüksiyon ve tedavi gruplarında çok şiddetli gözlenmemesi, doku hasarında apoptotik yolakların en son ürünü olan kaspaz-3 ün salınımının çok fazla olmadığı; buna karşın, apoptotik yolakta kaspaz-3 den önce salgılanan diğer kaspaz ve moleküllerin salgılarının tamamlanmamış olmasından dolayı apoptotik son yolağa henüz girilmemesi nedeniyle olabileceği düşünüldü.

HBO tedavisinin, tek taraflı üreter obstrüksiyonuna bağlı gelişen böbrek hasarında özellikle apoptotik hücre sayısı, e-NOS, i-NOS immunoreaktiviteleri ile bir miktar da kaspaz-3 salınımında azalmaya neden olarak iyileşmeye olanak sağladığı sonucuna varıldı.

V. TARTIŞMA

Bu çalışmada literatürde ilk olarak tek taraflı üreter obstrüksiyonuna bağlı böbrekte meydana gelen iskemik hasarın tedavisinde HBO nun etkili olabileceği gösterilmiştir.

Üst üriner sistem obstrüksiyonları, tedavi spektrumunu oldukça geniş patolojilerdir. Obstrüksiyonun düzeyi, derecesi ve süresi planlanacak tedavinin belirlenmesine yön vermektedir. Tedavide birincil amaç, obstrüksiyonu gidererek böbreğin fonsiyonel rezervini korumak ve/veya bir miktar geri kazanmaktır.

Üst üriner sistem obstrüksiyonlarında böbrek hasarı, ilk aşamada artan üreteral basıncın etkilenmesi ile başlarken daha sonra ortaya çıkan renal kan akımındaki azalmayla doku iskemisi ve hücrel atrofi meydana gelir ve nekrozla sonuçlanır (11). İ/R sırasında; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP' nin azalması, hücre içi kalsiyum artışı ve hücre iskeleti ile membran fosfolipidlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri oluşarak, oksidatif strese neden olur (110). Oksidatif streste ise serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar arasındaki denge serbest radikaller lehine bozulur (92, 164). Serbest oksijen radikalleri de hücrede DNA hasarına ve bunu takiben hücre ölümüne yol açar (102).

Günümüz tıbbında HBO uygulamaları, birçok hastalığın tedavi ve yardımcı tedavisinde yaygın olarak kullanıma girmiş bulunmaktadır. Öyle ki, refrakter osteomyelit, gazlı gangren anaerob mikroorganizmaların da işe karıştığı mikst yumuşak doku enfeksiyonları, akut iskemi ile sonuçlanan travmatik yaralanmalar, çeşitli deri greftleri ve iyileşmeyen yaralar gibi zor vakalar bile HBO' nun tedavi spektrumuna girmiştir (165).

HBO tedavisinin İ/R hasarının tedavisindeki olumlu etkisinin mekanizmaları gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır. HBO tedavisi İ/R hasarının nötrofiller, endotel, inflamatuvar mediyatörler, lipid peroksidasyonu ve mikrovasküler kan akımı gibi pek çok farklı elementi üzerine olumlu etkiler göstermektedir.

HBO tedavisi, literatürde yayınlanmış pek çok çalışmada miyokard, iskelet kası, ince barsak ve karaciğer gibi pek çok İ/R modelinde terapotik amaçlı olarak kullanılmış ve yararlı etkileri ortaya konmuştur (117-126).

Uzun ve ark. çalışmasında da HBO'nun testisin İ/R hasarı üzerine yararlı etkileri olduğu sonucuna varılmıştır ancak bu çalışmada da HBO'nun hangi mekanizmalar üzerinden etki gösterdiği ve testis dokusunda ne gibi immünohistokimyasal ve biyokimyasal değişikliklere yol açtığı değerlendirilmemiştir (166).

Kolski ve ark. çalışmalarında bilateral testis torsiyonu uyguladıkları ratlarda iskemi sırasında ve reperfüzyon sonrasında uyguladıkları HBO'nun etkilerini histolojik olarak değerlendirmişler ve sonuçta reperfüzyon sonrası uygulanan HBO'nun oluşan İ/R hasarını belirgin olarak azalttığını ortaya koymuşlardır (167).

Literatür tarandığında ürolojide iskemik defektlerin tedavisinde HBO tedavisinin etkinliğinin araştırıldığı görülmektedir. Ancak üreter obstrüksiyonuna bağlı nefropatide HBO etkinliğinin araştırıldığı bir çalışma yoktur.

Yöntem olarak en yakın araştırma Gürer ve ark.larının renal pedikül klemplenerek böbrekte İ/R hasarı oluşturulan çalışmadır (168). Bu çalışmada 4 grup oluşturulmuş, kontrol grubunda 6, diğer gruplarda 8'er adet olmak üzere rat kullanılmıştır. Bununla birlikte HBO tedavisinin veriliş zamanı ve dozu da bizim çalışmamızdan farklıdır. Gürer ve ark.ları HBO tedavisini cerrahiden 30 dakika önce 75 dakikalık tek doz olarak uygulamışlardır. Bu çalışmada araştırmacılar böbrekte iskemi oluşturan girişimlerden (transplantasyon, parsiyel nefrektomi gibi) önce uygulanacak HBO tedavisinin etkinliği araştırılmıştır. Bu nedenle amaçlar farklı olduğu için gruplarda ve HBO uygulanma şeklinde de farklılık olması doğaldır. Bizim çalışmamızda ise obstrüksiyonla oluşan iskemi durumlarında (taş hastalığı gibi) tedavinin hemen mümkün olmadığı hastalarda bu dönemde uygulanan HBO tedavisinin etkinliği araştırıldı.

Yine Gürer ve ark.larının çalışmasında HBO tedavisinin I/R hasarındaki potansiyel etkisi böbrek dokusunda MDA ve GSH düzeylerine bakılarak araştırılmıştır. Biz ise HBO tedavisinin etkinliğini aşağıda açıkladığımız gibi sadece immuno-histokimyasal verilerle araştırdık. Ancak her iki çalışmanın da ortak yanı olan histolojik incelemelerde benzer bulgulara rastlandı. İskemi oluşturmada tek doz HBO uygulanması sonrası kontrol grubuna göre doku MDA düzeylerinin düştüğü ve GSH düzeylerinde bir değişim olmadığı bulunmuştur. I/R gruplarında da aynı şekilde HBO tedavisi ile MDA seviyelerinde anlamlı düşmeye rağmen GSH'da anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak her iki tedavi grubunda da histopatolojik skorlarda düzelme saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise; böbrekte iskemik hasar TTÜO yoluyla oluşturuldu. HBO tedavisi ise üreter obstrüksiyonu sonrası 1. saatte başlayan 70'er dakikalık dozlarla, günde iki kez olmak üzere 10 gün boyunca uygulandı. Böylece tedavi grubunda böbrekte oluşturulan iskemik nefropatinin neredeyse tüm safhalarının HBO tedavisi altında gelişmesi sağlandı. HBO tedavisinin normal dokuya etkisi ise kontrol grubuna 20 seans HBO uygulanması ile araştırıldı.

Literatür incelendiğinde obstrüktif üropatinin en iyi ortaya konan modeli, tek taraflı üreter obstrüksiyon modeli olduğu için biz de çalışmamızda bu yöntemi uyguladık (169).

Tek taraflı tıkanıklık üropatileri sıklıkla böbrek taşlarının bir sonucudur. Populasyonun %12'sinde 70 yaşına kadar bir kez taş görülür. Hastaların %70'inde tıkanıklık düzeyi üreteropelvik bileşke, geri kalandaki üreterovezikal bileşke ile üreter orta kesimdir (170-172). Çalışmamızda taşların en çok görüldüğü üreteropelvik bileşkenin hemen altında üreterin 2/3 proksimali bağlanarak tam üreter tıkanıklığı oluşturuldu. Böylelikle akut olarak meydana gelen tıkanmaya verilen cevap değerlendirildi.

Renal hasarın ciddiyeti obstrüksiyonun süresi ile ilişkilidir. Obstrüksiyon periyodu uzadıkça obstrüksiyon sonrası fonksiyonlarda düzelme bozulmaktadır. Obstrüksiyonun ilk birkaç gününde papillarda düzleşme, distal nefronda geniş alanda dilatasyon ve proksimal tubulide geçici dilatasyon sonrası yavaşça atrofiye yöneliş olur. 7. gününde dilate

kollektör tubulide atrofi ve nekroz gelişir. 14. günde distal tubulide dilatasyon artar, proksimal tubuli epitelinde atrofi gözlenir. 28. günde ise meduller kalınlıkta %50 azalma oluşur. (11, 41). Bander ve ark.ları, obstrükte böbreğin yüzeyel ve jukstamedüller nefronlarının 24 saatlik obstrüksiyon sonucu %15'nin kaybedildiğini tespit etmiş ve bu kaybın 60 gün kadar sürdüğünü görmüştür (173). Tübülüs fonksiyonlardaki geri dönüş incelendiğinde bir haftalık obstrüksiyon sonrası konsantrasyonun tamamen düzeldiği izlenmiştir.

Heyman ve ark.larının çalışmasında, ratlarda 24 saatlik TTÜO'dan sonra böbreğin papilla ve forniksinde hemoraji ve nekroz tespit edilmiştir. Obstrüksiyondan 30 dakika sonra bile apoptozise uğrayan hücreler görülmüştür. Henle kulpunun çıkan kolunda hafif hasar saptanmıştır (174).

Capelouto ve ark.ları ise dört haftalık obstrüksiyonda idrarı konsantre etme yeteneğinin belirgin bozulduğu saptamıştır (175). Bununla birlikte bir diğer çalışmada, Fink ve ark.ları köpeklerde obstrüksiyondan dört gün sonra düzeltme yapılırsa fonksiyonlarda tama yakın geri dönüş olduğu görmüştür. Obstrüksiyondan 14 gün sonra düzeltme yapılır ise yaklaşık 4 ay içinde GFR ve tübüler fonksiyonların kontrol düzeylerinin %46'sına kadar düzeldiği tespit edilmiştir. Dördüncü aydan sonra fonksiyonlarda bir değişiklik görülmemiştir (176).

Bütün bu bilgilerin ışığında, bizim çalışmamızda obstrüksiyon süresi; obstrüksiyonun böbrekte geri dönüşümsüz hasar oluşturmadığı süreçle sınırlandırılmaya çalışıldı. Bu nedenle de on günlük üreter obstrüksiyon modeli oluşturuldu.

Ratlarda yapılan çalışmalarda obstrüksiyonun birinci haftasında proksimal tübülüslerde dilatasyon tespit edilmiştir. Ryuji ve ark.larının çalışmasında komplet obstrüksiyon uygulanmıştır (177). Gleasson ve ark.ları ise parsiyel obstrüksiyon yapmıştır (178). Her iki modelde de tübülüslerde birinci haftada obstrüksiyona sekonder dilatasyon bildirilmiştir. Komplet obstrüksiyon çalışmasında; obstrüksiyondan bir hafta sonra interstisyumda mononükleer hücre infiltrasyonu, orta düzey ödem ve fibrozis görülmüştür. Obstrüksiyonun 2. ve 3. haftalarında ise inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu korteks ve medullada maksimuma çıkmıştır. Etkilenen tübülüslerin etrafında

yoğun bir şekilde interstisyel fibrozis görülmüştür. Obstrüksiyonun 4. haftasında ise inflamatuvar hücre infiltrasyonu azalmış, interstisyel bölge genişlemiş ve böbrekte yoğun fibrozis görülmüştür (177).

Çalışmamızda yapılan histolojik değerlendirme sonucunda; on günlük obstrüksiyon uygulanan grupta, glomerül yapıları normal iken, proksimal ve distal tubuluslarda ödem, konjesyon ve yer yer piknotik çekirdekli hücrelere rastlandı. Bununla beraber tubuluslarda dilatasyon da izlendi. Henle kulbunun inen, çıkan ve ince kısımlarında ve toplayıcı kanallarda yer yer piknotik çekirdekli hücreler gözlemlendi. Bu bulgular yukarıda sözü edilen birçok çalışmanın verileriyle uyumludur ve istenilen düzeyde obstrüktif hasar oluşturulduğunu kanıtlamaktadır.

Daha eski çalışmalar üriner obstrüksiyonun renal hemodinamik ve fonksiyonel neticeleri üzerine yoğunlaşmaktaysa da, son 15 yıldaki çalışmalar hücresel ve moleküler olaylar üzerinde durmaktadır (179). Akut tıkanıklığa bağlı nefropatilerde oksidatif stresi artırıcı pek çok etki gösterilmiştir. Tıkanıklığa bağlı nefropatilerde ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin en önemli kaynağı membranın aktive ettiği PMNL'dir. Aktive olan PMNL'den salınan süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve hipoklorik asit gibi reaktif oksijen ürünleri protein ve lipid yapılarında hasara neden olmaktadır (180).

Screiner ve ark.ları çalışmalarında ilerleyen renal hasarın, glomerüllerde ve tübülointerstisyel alanlardaki mononükleer hücre infiltrasyonu ile bağlantısı olduğu göstermiştir (181). Obstrüksiyonun ilk 24 saatinde mononükleer hücrelerin kortekse ve medullaya göç ettikleri görülmüştür (182).

Nathan ve ark.larının çalışmasında, tek taraflı üreteral obstrüksiyonda mononükleer hücrelerin interstisyumdaki fibroziste rol alabileceği gösterilmiştir (182).

Haris ve ark.larının çalışmasında, obstrüksiyonda lökosit invazyonu önlendiğinde, postobstrüktif dönemde GFR ve renal kan akım oranlarının kontrol grubuna göre daha iyi olduğu görülmüştür (183). Lökosit invazyonunun obstrüktif nefropatide önemli rol oynadığı düşünülmektedir

(183). Obstrüksiyona sekonder oluşan vazokonstriksiyonda ve fibrozisde makrofajların yanısıra önemli rolleri olduğu düşünülen vazoaktif maddeler de unutulmamalıdır.

PMNL doku yıkımı ve ödemi ile yakın ilgisinden dolayı İ/R hasarı sırasında HBO tedavisi çalışmalarının odak noktası haline gelmiştir (128, 129). Bu konuda yapılan çalışmalarda HBO' nun PMNL adezyonu ve mikrovasküler kan akımı üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (124).

Chen ve ark.ları tarafından yapılan in vitro çalışmalarda HBO'nun PMNL'nin adezyondan sorumlu CD18 bölgesinin fonksiyonunu PMNL siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini baskılayarak etkilediği gösterilmiştir (130). HBO tedavisi PMNL'nin adezyonundan sorumlu bir diğer komponent olan endoteli de adezyondan sorumlu indüklenebilir hücresel adezyon moleküllerinin (CAM) sentezini baskılayarak etkiler.

Çalışmamızda PMNL hücrelerinin obstrüktif dokuya invazyonu ve HBO tedavisinin PMNL adezyonuna etkisi değerlendirilmedi. Bunun yerine olası mekanizmanın araştırılmasında daha çok NO sentez aktivitesi ve apoptotik süreç üzerinde duruldu.

Deneyssel olarak İ/R ile oluşturulmuş böbrek hasarında, serbest oksijen radikalleri direk hücrede hasara yol açmaktadır ve bu hasarın şiddetine göre hücrenin ya apoptoz ya da nekroz ile ölüme gittiği gösterilmiştir. Vinas ve ark.ları böbrek İ/R hasarından sonra apoptoz pozitif hücre sayısında artış olduğunu göstermiştir (184). Nagle ve ark.larının, TTÜO'lu tavşanda interstisyel hücrelerin proliferasyonunu incelemek için yaptığı çalışmada en fazla işaretlenmenin interstisyel fibroblastlarda olduğu bulunmuştur. Fazla işaretlenmiş olan korteks ve dış medullada hücreler genişlemiş bir interstisyel mesafe ile ayrılmıştır. İşaretlenmenin az olduğu iç medullada ise hücreler normal uzaysal ilişkilerini sürdürmüşlerdir (185). Tubüler apoptozis 15. günde maksimum iken, interstisyel apoptozisin 45. günde hala arttığı görülmüştür. Chevalier ve ark.ları çalışmalarında üç günlük TTÜO'lu erişkin ratlarda hem tübüler hem de interstisyel kompartmanlarda apoptozis ve proliferasyonda artış olduğunu tespit etmiştir (186).

Çalışmamızda TUNEL tekniği ile yapılan apoptotik hücre sayımı sonucunda; literatürle uyumlu olarak obstrüksiyon uygulanan grupta diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde apoptotik aktivite artışı saptandı (korteks: $p<0.001$, medulla $p<0.001$).

HBO tedavisi uygulanan grupta (Grup 4) apoptotik hücre sayısının obstrüktif gruptan (Grup 3) daha az olduğu ve farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (Korteks'te 6.67 ± 1.73 ya karşın 3.34 ± 1.32 , $p<0.01$, Medulla'da 10.33 ± 3.43 karşın 5.78 ± 2.39 , $p<0.001$).

Apoptoz mekanizması henüz tam anlaşılmamakla birlikte asıl önemli olan yolağın kaspazların aktivasyonu olduğu düşünülmektedir (103). Kaushal ve ark. böbrek tübül hücrelerinde ve I/R hasarında kaspazların katılımını göstermiştir (187, 188). Kaspazlar, sistein içeren hücre içi inaktif bulunan proteazlardır. Apoptoziste hücre içi sinyaller mitokondri aracılığı ile kaspazları aktive ederler. Aktive olan kaspazlar ise DNA bağlantısını kırarak endonükleazların ortaya çıkmasına yol açarlar, aktini yıkarlar ve hücre membranında konfigürasyon değişiklikleri meydana getirirler.

Apoptozda başlangıç fazı için sinyal gereklidir ve bu sinyaller ekstresek reseptör aracılıklı yol veya intrinsek mitokondrial yolla oluşabilir. Her iki yol da kaspazları aktive ederek apoptozisi başlatır. Ekstresek yol; ölüm ligantlarının (TNF α , Fas) hücre membranında bulunan reseptörlerine bağlanması ve kaspaz-8 aktivasyonu ile seyreden bir süreçtir. Buna karşılık intrinsek yol; hipoksi, oksidan maddeler gibi etkenler sonucunda tetiklenen ve kaspaz-9'un aktive olduğu bir süreçtir. Her iki yol da sonuçta kaspaz-3 aktivasyonuna neden olur. Çalışmamızda yapılan immünohistokimyasal inceleme sonucunda; kaspaz-3 immunoreaktivitesinin kontrol grubunda negatif iken, cerrahi sham grubunda çok zayıf şiddette olduğu gözlemlendi. Bununla beraber obstrüksiyon grubunda kaspaz-3 immunoreaktivitesinin korteks ve medullada zayıf olduğu, tedavi grubunda ise azaldığı ve çok zayıf şiddette olduğu bulundu. Obstrüksiyon grubuyla karşılaştırıldığında tedavi grubunda azalmış kaspaz-3 reaktivitesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($P> 0.05$).

Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin beklenenin aksine obstrüksiyon ve tedavi gruplarında çok şiddetli gözlenmemesi, doku hasarında apopitotik yolların en son ürünü olan kaspaz-3 ün salınımının çok fazla olmadığı; buna karşın, apopitotik yolda kaspaz-3 den önce salgılanan diğer kaspaz ve moleküllerin salgılarının tamamlanmamış olmasından dolayı apopitotik son yolağa henüz girilmemesi nedeniyle olabileceği düşünüldü.

Ancak bu çalışmada obstrüksiyon grubunda yapılan apopitotik hücre sayımlarında, kontrol ve sham grubuna göre istatistiksel olarak da artmış görülen apopitozis oranları, zayıf şiddetle de olsa kaspaz-3 reaktivitesinin gruplar arasında hücre ölümü açısından anlamlı bir fark oluşturabildiğini göstermektedir.

Apopitozis, TNFa ve Fas ligantları ile başlayan ve 14 farklı kaspaz molekülünün ardışık aktivasyonu ile gerçekleşen kompleks bir süreçtir. HBO tedavisinin apopitotik yolda hangi mekanizmalarla etki gösterebileceği konusu tüm bu basamakları irdelleyen bir araştırmaya konu olabilir.

İ/R hasarında iNOS geninin de olaya karıştığı bilinmektedir. Böbreklerde, İ/R hasarı oluşturulup immünohistolojik olarak çalışmalar yapılmış; sonuç olarak artmış apopitotik hücrelere ilaveten iNOS mRNA düzeyinin de arttığı gösterilmiştir (96).

NO böbrekte birçok fonksiyonu etkiler. Bunlar; böbrek kan akımının otoregülasyonu, renin sekresyonu, glomerüler, mezengial ve epitelyal hücre aktivitesi, tubuloglomerüler geri dönüş mekanizması ve tübüler fonksiyonlardır. NO'in bazal düzeyde üretimi normal glomerüler fonksiyon için gereklidir. NO sentezinin inhibisyonu efferent arteriol rezistansında artmaya, dolayısıyla glomerüler kapiller basınçta artmaya yol açar (189).

NO'in İ/R hasarındaki rolü tartışma konusudur (190). İskemik dokunun reperfüzyonu nötrofil aktivasyonuna ve permeabilite değişikliklerine yol açar. Kubes ve ark.ları, NO'in in vitro olarak postkapiller venüllerdeki endotelyal hücrelere nötrofil yapışmasını modüle ettiğini ve burada endojen NO sentezindeki bozukluğun endotelyuma lökosit yapışması ile sonuçlandığını göstermiştir (191). Ancak başka araştırmalarda eksojen NO'in renal İ/R'da

faydalı olurken, endojen NO'nın renal iskemi-reperfüzyon veya septik şokta önemli bir katkısının olmadığı gösterilmiştir (192, 194).

NO üretiminin artması renal hasarın oluşmasında önemli bir basamaktır. NO güçlü bir vazodilatör olmasına rağmen proinflamatuvar aktivitesi bunun önüne geçerek I/R'da faydalı hemodinamik etki yapmasını engellemektedir. İ/R sırasında NO sentezi için iNOS aktivitesi artış gösterir (195). iNOS tarafından üretilen NO çeşitli dokularda olduğu gibi böbrek İ/R hasarının patofizyolojisinde de önemli bir rol oynamaktadır (93, 195, 196).

Ratlarda 30 dk iskemiye takiben 30 dk reperfüzyon uygulanan bir çalışmada I/R sonrasında NO metabolitlerinin plazma seviyelerinde azalmaya karşın, renal NO metabolitlerinin klirensi ve atılımında artma olduğu gösterilmiştir. Atılımdaki bu artışın RKA veya GFH'dan bağımsız olduğu fakat NO metabolitlerinin tübüler reabsorbsiyonunda bozulmadan ve intrarenal NO üretiminde artıştan kaynaklandığı ifade edilmiştir (189).

İndüklenebilir NO sentaz (iNOS) enzim geni bulunmayan ratların kullanıldığı bir çalışmada renal I/R hasarının azaldığı gösterilmiştir (197). Diğer bir çalışmada; hipoksinin iNOS genini aktive ederek NO üretimini arttırdığı, böylece inflamasyonu artırıcı etki yaparak zararlı etkilerin açığa çıktığı ileri sürülmüştür (198).

Bazı yayınlarda endojen NO'nın zararlı etkilerinin serbest oksijen radikalleri ile reaktivitesinden dolayı olabileceği öne sürülmekte ve bu radikaller ile beraber kendisi serbest bir radikal olan NO'nın reperfüzyon sonrası gözlenen hasardan sorumlu olabileceği bildirilmektedir (199, 200).

NO ve süperoksit anyonu spontan olarak toksik peroksinitrit iyonunu oluşturmak üzere reaksiyona girerler. Peroksinitrit oldukça kuvvetli ve değişken bir oksidan olup lipid, protein ve DNA ile reaksiyona girer (90, 101). Bu reaksiyonlar NO' in çok sayıdaki sitotoksik etkisini açıklayabilir. Çünkü hem süperoksit anyonu hem de NO dokuda İ/R hasarına katkıda bulunur (101). Peroksinitrit, protein tirozin nitrasyonu yoluyla veya OH ve NO' e ayrışarak dokuda direk oksidan hasara neden olur (90). Özellikle böbrekte peroksinitrit oluşumu İ/R patofizyolojisinde rol oynar (102).

Yapılan çalışmalarda böbrek İ/R hasarında, böbrek fonksiyon bozukluklarının iNOS aktivitesinin inhibisyonu ile azaltılabileceği bildirilmektedir (90, 96, 102, 201). Oksidatif hasarın baskılanması sebebiyle NOS inhibisyonu yararlı olmakla beraber NOS'un kuvvetli vazoaaktif inhibisyonu İ/R hasarını arttırmaktadır (202). Bu durumda aşırı NO üretimini ve reperfüzyonda peroksinitrit yapımını azaltan ancak fizyolojik NO üretimine minimal etkili bir NOS inhibitörünün seçimi ve konsantrasyonu çok önemli olabilir.

Çalışmamızda tüm gruplarda e-NOS ve i-NOS immünreaktiviteleri değerlendirildi. Obstrüktif grupta e-NOS ve i-NOS immünoreaktivitesinin hem kortekste hem de medullada kontrol ve sham grubuna oranla arttığı, tedavi grubunda ise zayıf şiddette olduğu ve obstrüksiyon grubuna oranla azaldığı izlendi. Obstrüksiyon sonrası e-NOS ve i-NOS artışı literatür ile uyumluydu ve istatistiksel olarak da anlamlıydı. Tedavi sonrası değerler de istatistiksel olarak anlamlı düzeylere gerilemişti (Tablo 11, 12) . Bu sonuç da bize HBO nun tedavi etkinliğini literatürle uyumlu olarak e-NOS ve i-NOS inhibisyonu üzerinden yapabileceğini gösteriyordu.

HBO'nun bu yaygın kullanımı ve bildirilen yararlarına rağmen, 2 ATA'nın üzerindeki hiperbarik şartların (zaten aerobik hayatın bir zorunluluğu olan) serbest oksijen radikali üretiminde artışa yol açarak, oksidatif strese neden olduğu yönünde görüşler de mevcuttur (203, 204). Çalışmamızda HBO tedavisinin sağlıklı dokulara olası toksik etkisini değerlendirebilmek amacıyla hiçbir müdahalede bulunulmayan sağlıklı ratlardan oluşan kontrol grubuna 2.4 ATA basınçta 20 seans HBO tedavisi de uygulandı. Çalışma sonunda kontrol grubunda yapılan değerlendirmede; histolojik değişiklikler, apoptotik hücreler, kaspaz-3 ve e-NOS, i-NOS immünreaktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler izlenmedi. Literatürde de, HBO kaynaklı oksidatif stresin boyutlarını ortaya çıkarmaya yönelik çalışmalardan çok antioksidan savunma sistemlerini kuvvetlendiren çeşitli maddeler verilmesi yoluyla HBO'nun zararlı etkilerinin bertaraf edilmesinin amaçlandığı, ya da tam aksine antioksidan enzimleri inhibe ederek oksijen toksisitesinin ne ölçüde arttığını araştıran çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmalar, 3 ATA' nın

üzerindeki toksik dozlarda gerçekleştirilmiştir (205- 209). Oysa ki tedavide kullanılan HBO dozları genellikle 2-3 ATA arasında yer almaktadır (210, 211). Bu nedenle bu çalışmanın kontrol grubu verilerine baktığımızda uygun tedavi basıncında (2.4 ATA) HBO tedavisi uygulandığı için korkulan yan etkilerin olmadığını düşünüyoruz.

Bilindiği gibi TTÜO'nun tedavisi, obstrüksiyon sebebiyle yerleşen geri dönüşü olmayan fibrotik değişimler nedeniyle sınırlıdır. Halen altın standart tedavi cerrahi olarak obstrüksiyonun ortadan kaldırılması olsa da, cerrahi öncesi ve sonrası dönemde uygulanacak ek tedaviler bu hasarı azaltabilecektir.

Bu çalışmada HBO nun TTÜO ve benzeri üriner obstrüksiyona ikincil gelişen doku hasarlarında asıl tedavi olan obstrüksiyonun düzeltilmesine kadar geçen sürede etkili olabileceği yönünde veriler elde edildi. Ancak uygulamanın hasta bazında yapılabilmesi için en iyi doz, süreyi öne çıkarak çalışmalara gereksinim vardır.

VI. SONUÇLAR

Ratlarda akut tek taraflı üreteral tam obstrüksiyona bağlı gelişen renal hasarın tedavisinde hiperbarik oksijen tedavisinin etkinliğini araştırdığımız deneysel çalışmanın sonuçları şunlardır:

1. Obstrüksiyon uygulanan grupta histolojik değişikliklerin gözlenmesi obstrüksiyon varlığını gösterirken, apoptotik hücrelerin özellikle obstrüksiyon grubunda fazla olması hücre hasarının varlığını desteklemektedir.
2. HBO tedavisi ile histolojik olarak farklılık gözlenmez iken, moleküler düzeyde apoptotik hücre sayısının azaldığı saptanmıştır.
3. Obstrüksiyon ile böbrek dokusunda hem e-NOS hem de i-NOS immunoreaktivitelerinin kontrol ve sham gruplarına oranla daha fazla olduğunun gözlenmesi doku hasarı ile birlikte e-NOS ve özellikle de i-NOS salgısında artış olduğunu desteklemektedir.
4. HBO tedavisi sonrası moleküler açıdan dokuda e-NOS, i-NOS immunoreaktivitelerinde azalmanın gözlenmesi ile, HBO'nun doku hasarına karşı koruyucu etkisinin bu moleküllerin salgısını azaltarak da sağlayabildiği düşünülmüştür.
5. Kaspaz-3 immunoreaktivitesi beklenenin aksine obstrüksiyon ve tedavi gruplarında çok şiddetli gözlenmemiştir.
6. HBO tedavisi ürolojide çok yeni bir konu olup özellikle etki mekanizmasının aydınlatılmasını amaçlayan ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

AKUT TEK TARAFLI ÜRETERAL TAM OBSTRÜKSİYONA BAĞLI GELİŞEN RENAL HASARIN TEDAVİSİNDE HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI: RAT MODELİ İLE DENEYSEL ÇALIŞMA

AMAÇ:

Ratlarda deneysel olarak oluşturulacak akut tek taraflı üreter obstrüksiyonu'nun (TTÜO) böbrekte neden olduğu hasarın tedavisinde ve/veya önlenmesinde hiperbarik oksijen (HBO) tedavisinin etkinliği araştırılmıştır.

MATERYAL METOD:

Çalışmaya alınan 28 rat 4 gruba ayrıldı: Kontrol (HBO), Cerrahi Sham, Obstrüksiyon (TTUO) ve Tedavi (TTUO + HBO).

Üreter obstrüksiyonu oluşturmak için: sol üreter 3/0 ipekle sütür konularak klemplendi. Operasyon sonrası ratlara 10 gün süre ile günde 2 kez HBO tedavisi uygulandı. Çalışma sonunda tüm gruplara ait denekler kurban edildi. Böbrek dokularından elde edilen kesitler histokimyasal inceleme için hematoksilin-eozin ile boyandı. İmmunohistokimyasal inceleme için ise anti-eNOS, ant,-iNOS ve anti-kaspaz-3 antikorları kullanıldı. Apoptotik hücreler TUNEL yöntemi ile tanımlandı.

BULGULAR:

HBO tedavisi ile histolojik olarak farklılık gözlenmez iken, moleküler düzeyde apoptotik hücre sayısının bir miktar azaldığı saptanmıştır.

HBO tedavisi ile dokuda e-NOS, i-NOS immunoreaktivitelerinde azalma gözlenmiştir. Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin beklenenin aksine obs ve tedavi gruplarında çok şiddetli gözlenmemiştir.

SONUÇ:

Akut tek taraflı üreter obstrüksiyonunun Hiperbarik Oksijen Tedavisinin yararlı etkileri görülmüş, böbrek hasarında bir miktar iyileşmeye olanak sağlamıştır.

Ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

SUMMARY

INVESTIGATION OF HYPERBARIC OXYGEN THERAPY EFFICENCY IN THE TREATMENT OF RENAL INJURY DUE TO UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION: AN EXPERIMENTAL STUDY IN RAT MODEL

Aim: The aim of this study was to determine the effect of hiperbaric oxygen (HBO) treatment on renal injury due to acute unilateral ureteral obstruction (UUO) in rats.

Materials and Methods: Twenty-eight male Wistar albino rats were randomly divided into four groups. Group I, underwent a control group and only HBO treatment was performed for 10 days. Group II sham operation; Group III left UUO and Group IV left UUO and HBO treatment was performed for 10 days.

All surgical procedures were performed while the rats were under a single intramuscular injection of 60 mg/kg ketamine and 9 mg/kg xylazine. An incision was made in the midline of the abdomen, and the left proximal ureter was exposed and was ligated using 3-0 silk.

HBO treatment was performed with a monoplace chamber. The rats in groups I and IV were subjected to two session of HBO (2.8-ATA treatment for 60 minutes) per day during 10 days after the surgery.

Kidneys from all groups were collected from animals after sacrifice. Histological specimens were fixed in 10% formalin solution. After routine paraffin embedding procedure for specimens, sections were stained routinely with hematoxyline-eosine stain for histochemical observation. In addition, e-NOS and i-NOS distributions were also detected using indirect immunohistochemistry technique.

Results: After histochemical observation, cortex and medulla of kidney were observed as normal in group 1 and group 2. However, while glomerules were normal in both group 3 and group 4, there were picnotic nuclei and edema in collecting tubule cells. After TUNEL staining, while the TUNEL positive cells were negative in control group, they were detected other groups. TUNEL positive cells were rarely observed in sham group, they were increased in obstructive groups. However, after treatment with HBO, the number of TUNEL positive cells decreased. After immunohistochemical observation, weak immunoreactivities of e-NOS and i-NOS were detected in group 1 in both cortex and medulla, weak immunoreactivity of e-NOS and moderate immunoreactivity of i-NOS were observed in group 2. In group

3, e-NOS and i-NOS immunoreactivities were increased when compared with group 1, 2 and 4, after treatment with HBO, slightly decreased intensity of e-NOS and i-NOS were detected. Glomerules in all group were not stained positively. Caspase-3 immunoreactivity was negative in both control and sham groups, it was slightly more detectable in obstructive group when compared with treated group.

Conclusion: After obstruction of kidney, the apoptosis and the secretion of e-NOS, i-NOS and caspase-3 were slightly inhibited after short time period of HBO treatment.

KAYNAKLAR

1. Lameire N., Van Biesen W., Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* 2005; 365 9457: 417-430
2. Yokoyama H. Tsuji Y. Diuretic doppler US in chronic unilateral partial ureteric obstruction in dogs. *BJU International* 2002; 90:100-104
3. Kindwall EP. A history of hyperbaric medicine. In: Kindwall EP (ed.) *Hyperbaric Medicine Practice*, Arizona, Best Publishing Company 1994; 2-16.
4. Tandara AA, et al. Oxygen in wound healing—more than a nutrient. *World J Surg* 2004;28:294–300.
5. Grolman RE, et al. Transcutaneous oxygen measurements predict a beneficial response to hyperbaric oxygen therapy in patients with nonhealing wounds and critical limb ischemia. *Am Surg* 2001;67:1072–1080.
6. Hammarlund C, et al. Hyperbaric oxygen treatment of healthy volunteers with U.V.-irradiated blister wounds. *Burns* 1991;17:296–301.
7. Thom SR, et al. Delayed neuropsychologic sequelae after carbon monoxide poisoning: prevention by treatment with hyperbaric oxygen. *Ann Emerg Med* 1995;25:474–480.
8. Huang Z, et al. Hyperoxygenation enhances the tumor cell killing of photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2003;78:496–502.
9. Klahr S. New insights into the consequences and mechanisms of renal impairment in obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis.*1991;18:689-699
10. Klahr S., Purkerson ML. The pathophysiology of obstructive nephropathy: the role of vasoactive compounds in the hemodynamic

- and structural abnormalities of the obstructed kidney. Am J Kidney Dis. 1994; 23:219-223
11. K peli S., K peli B.  riner Obstr ksiyonlar. Anafarta K., G      O., Nihat A., Bed k Y. Temel  roloji 1998 G ne  Kitabevi, Sayfa 270-294
 12. Walsh C P, Retik B A, Vaughan D E, Wein A C. Campbell's Urology. 8th Ed, USA: Elsevier Science, 2002; 2: 1735-1765
 13. Kubo T, Kawamura S. Anatomy and function of upper urinary tract Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi. 1992; 83(11):1759-66
 14. Hinman FJ. Development of the kidney, ureter and adrenal gland. In: Hinman FJ(eds). Atlas of urosurgical anatomy. WB Saunders Company, Philadelphia 1996; pp 235-254.
 15. Redman JF. Anatomy of genitouriner system. in: Gillenwater JY (eds). Adult and pediatric urology. Mosby Year Book Inc., St.Louis 1991; pp 1-631.
 16. Tisher CC, Madsen KM. Anatomy of the kidney. In: Brenner BM(eds). The Kidney. WB Saunders Company, Philadelphia 1996; pp 3-72.
 17. Erduran D.,  st Sistemin Ekstresek Ve İntrensek Obstr ksiyonlari T YK 2004; Sayfa 43-46
 18. Guyton AC. The kidneys and body fluids. In: Guyton AC (eds). Textbook of Medical Physiology. WB Saunders Company, Philadelphia 1991; pp 273-353.
 19. Lance DD, Brenner BM. The renal circulation in: Brenner BM (eds). The Kidney. WB Saunders Company, Philadelphia 1996; pp 247-286.
 20. Navar LG, Carmines PK, Mitchell KD. Renal circulation in: Massry SG, Glasscock RJ (eds). Text book of nephrology. Wiliams and Wilkins Baltimore, 1995; pp 41-54.

21. Madox DA, Brenner BM: Glomerular ultrafiltration. in: Brenner BM(eds). The Kidney. WB Saunders Company, Philadelphia 1996; pp 286-334.
22. Kon VI. Glomerular filtration. in: Massry SG, Glasscock RJ (eds). Text book of nephrology. Williams and Wilkins, Baltimore 1995; pp 54-60.
23. Tanagho E A, McAninch J W. Smith's General Urology. 16th Ed, San Francisco: McGraw-Hill , 2004; 1: 1-17
24. Junquera C J, Carneiro J, Kelley O R. Temel Histoloji. 7. baskı, İstanbul: Barış Kitabevi, 1992; 437-461
25. Guyton C A. Tıbbi Fizyoloji. 7. baskı, İstanbul: Merk Yayıncılık, 1987; 2: 649-664
26. 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.
27. Suki WN, Guthrie AG, Martinez-Maldonado M, Eknayan G: Effects of ureteral pressure elevation on renal hemodynamics; and urine concentration. Am J Physiol 1971;220:38-43.
28. Wilson DR: Pathophysiology of obstructive nephropathy. Kidney Int 1980; 18:281-292.
29. Solez K, Ponchak S, Buono RA. Vernan N, Finer PM, Miller M, Heptinstall RH. inner medullary plasma flow in the kidney with ureteral obstruction. Am J Physiol 1976; 231:1315-1321.
30. Hanley MJ, Davidson K: Isolated nephron segments from rabbit models of obstructive nephropathy. J Clin Invest 1982;69:165-174.
31. Nielsen S, Kwon T, Christensen B, et al: Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. J Am Soc Nephrol 1999; 10:647-663.
32. 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.

33. 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.
34. Moody TE, Vaughn ED Jr, Gillenwater JY. Relationship between renal blood flow and ureteral pressure during 18 hours of total unilateral ureteral occlusion. Implications for changing sites of increased renal resistance. *Investig Urol* 1975;13:246-251.
35. Harris RH, Yarger WE: Renal function after release of unilateral ureteral obstruction in rats. *Am J Physiol* 1974;227:806-815.
36. Yarger WE, Griffith LD: Intrarenal hemodynamics following chronic unilateral ureteral obstruction in the dog. *Am J Physiol* 1974;227:816—826.
37. Hvistendahl JJ, Pedersen TS, Jorgensen HH, et al: Renal hemodynamic response to graded ureter obstruction in the pig. *Nephron* 1996;74:168-174.
38. Radović N., Čuzić S., Knotek M. Effect of Unilateral Ureteral Obstruction and Anti-angiotensin II Treatment on Renal Tubule and Interstitial Cell Apoptosis in Rats. *Croat Med J.* 2008;49:600-7
39. Eddy A: Molecular insights into renal interstitial fibrosis. (Editorial) *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2495-2508.
40. Weiss R.M. Physiology and pharmacology of the renal pelvis and ureter In Walsh PC, Retnik AB, Vaughan ED, Wein AJ. Eighth Edition, *Campbell's Urology* Philadelphia: WB Saunders 2002; Volume 1 Page 377-401
41. Gulmi F. A., Felsen MD. D., In Vaughan PhD E. D., Jr, MD Pathophysiology of urinary tract obstruction, Walsh PC, Retnik AB, Vaughan ED, Wein AJ. Eighth Edition, *Campbell's Urology* Philadelphia: WB Saunders 2002; Volume 1 page 411-456
42. Nguyen H. T., Kogan B. A. Upper urinary tract obstruction :experimental and clinical aspects *BJU* 1998; 81:2. 13-21
43. Platt J. F. Advances in ultrasonography of urinary tract obstruction *Abdom Imaging* 1998;23:3-9

44. Mustonen S. , Ala-Houhala I.O., Vehkalahti P. , Laippala P. , Tammela T.L.J. Kidney ultrasound and Doppler ultrasound findings during and after acute urinary retention. *European Journal of Ultrasound* 2001;12: 189-196
45. Vaughan E. D. Jr, Donald M. , Poppas D. P. and Felsen D. Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York *Journal of Urology* 2004; 172:2563-69
46. Platt J. F. Duplex doppler of native kidney dysfunction *AJR* 1992; 158:1035-1042
47. Schmid-Schonbein G. Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. *FASEB J* 1987; 46:2397-2401.
48. Ames A, Wright RL, Kowada M, et al. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 1968; 52:437-453.
49. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi-step paradigm. *Cell* 1994; 76:301-314.
50. Malik A, Siu K. Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharm Rev* 1996; 48:213-229.
51. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, et al. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1987; 253:H699-703.
52. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leuk Biol* 1997; 61:647-653.
53. Tomur A, Etlik O, Gundogan NU. Hyperbaric oxygenation and antioxidant vitamin combination reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin-flap model. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2005;16(4):275-285.

54. Adanali G, Ozer K, Siemionow M. Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2002;110(4): 1344-1351.
55. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. 4 Th Ed Philadelphia. W.B. Saunders Company 1995; 3-12.
56. McDougal, W. S. The diagnosis, management, and pathophysiology of acute renal failure in surgical patients. 1985; A.U.A. Update Series, vol. IV: lesson 7.
57. Chien KR, Abrams J, Serroni A, Martin JT, Farber JL. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem* 1978; 253: 4809.
58. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery* 1994; Volume 81, Issue 5, Pages: 637-647.
59. Jacob RA, Burr BJ. Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr* 1996; 63:985-90.
60. Heinzelman M, Mercer-Jones MA, Passmore JC. Neutrophils and renal failure. *Am J Kidney Dis* 1999; 34(2): 384-99.
61. Hellberg PO, Kallskog TO. Neutrophil-mediated post ischemic tubular leakage in the rat kidney. *Kidney Int* 1989; 36(4): 555-561.
62. Yagi K. Assay of blood plasma or serum methods in enzymology. 1984; 105:328-31.
63. Brady HR, Brenner BM, Liebarthus W: Acute renal failure. *The Kidney*. WB Saunders Company, Philadelphia 1996; pp 1200-1252.
64. Vetterlein F, Petho A, Schmidt G. Distribution of capillary blood flow in rat kidney during postischemic renal failure. *Am J Physiol* 1986; 251: 510.

65. Shires GT; Cunningham JN, Backer CRF, Reeder SF, Illner H, Wagner IY, Maher J. Alterations in cellular membrane function during hemorrhagic shock in primates. *Ann Surg* 1972; 176: 288.
66. Farber JL. The role of calcium in cell death. *Life Sci* 1981; 29:1289.
67. Fleckenstein A. Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *Ann Rev Pharm Toxicol* 1977; 17:149.
68. Hinnen R, Miyamoto H, Racker E. Calcium translocation in Ehrlich ascites tumor cells. *J Membr Biol* 1979; 49: 309.
69. Humes, H. D.: Role of calcium in pathogenesis of acute renal failure. *Amer J Physiol* 1986; 250: F579.
70. Chien KR, Abrams J, Serroni A, Martin JT, Farber JL. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem* 1978; 253: 4809.
71. Dunn MJ. Renal prostaglandins. In: *Renal Endocrinology*. Edited by M. J. Dunn. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. 1983; chapt. 1: p. 4.
72. Yin HL, Stossel TP. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 1979; 281: 583.
73. Dedman JR, Binkley BR, Means AR. Regulation of microfilaments and microtubules by calcium and cyclic AMP. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1979; 11: 131.
74. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984; 74: 1156.
75. Arnold PE, Lumertguld, Burke TJ, Schrier RW. in vitro versus in vivo mitochondrial calcium loading in ischemic acute renal failure. *Amer J Physiol* 1985; 248: F845.

- 76.Reilly PM, Schiller HJ, Bulkey GB. Pharmacological approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161:488-502.
- 77.Feher J, Csomos G, Vereckei A (eds). The chemistry of free radical reactions.in: *Free Radical Reactions in Medicine*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1987, 2-10.
- 78.Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. Serbest radikaller. *Türkdenn*. 1996; 30: 116122.
- 79.Erenel G, Erbaş D, Ancioğlu A. Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi medical journal*. 1992; 243-250.
- 80.Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. *Mimoza yayınlan*. 1995; 3-95.
- 81.Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. Serbest radikaller. *Türkdenn*. 1996; 30: 116122.
- 82.Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1984;1396-1397.
- 83.Younes M, Siegers CP. Interrelation between lipid peroxidation and other hepatotoxic events. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 2001-2003.
- 84.Garcia JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, et al. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett* 1997; 408(3): 297-300.
- 85.Trimarchi H, Mongitore MR, Baglione P, et al. N-acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patients—a pilot study. *Clin Nephrol*. 2003; 59(6): 441-446.
- 86.Aganval R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin 11 blockade. *Am J Physiol* 2003; 284(4): F863-F869.

87. Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 2002; 8(4): 323-34.
88. Yamaguchi T, Oishi K, Uchida M, Echizen H. Edaravone, a radical scavenger, may enhance or produce antiproliferative effects of fluvastatin, amlodipine, ozagrel, GF109203X and Y27632 on cultured basilar artery smooth muscle cells. *Biol Pharm Bull* 2003; 26 (12): 1706-10.
89. Cuzzocrea S., Salvemini D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes, *Kidney International* 2007; 71:290-297.
90. Mark L.A., Robinson A.V., Schulak J.A., , Inhibition of Nitric Oxide Synthase reduces Renal Ischemia/Reperfusion Injury, *Journal of Surgical Research* 2005; 129:236-241.
91. Rhoden, E.,L., Rhoden, C.R., Lucas, M.L., Pereira-Lima, L., Zettler, C., Bello-Klein, A., The role of nitric oxide pathway in the renal ischemiareperfusion injury in rats, *Transplant Immunology* 2002; 10:277-284.
92. Sasaki M., Takashi J. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2006; 40:1-12
93. Wang L.M., Tian X.F., Song Q.Y., Gao Z.M., Luo F.W., Yang C.M. Expression and role of inducible nitric oxide synthase in ischemiareperfusion liver in rats, *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 2003; 2:252-258.
94. Cauwels A. Nitric oxide in shock. *Kidney International* 2007; 72:557-565.
95. He T., Xing Y.Q., Zhao X.H., Ai M. Interaction between iNOS and COX-2 in hypoxia-induced retinal neovascularization in mice *Arch. Med. Res.* 2007; 39(2):261-3.

96. Vinas L.J., Sola A., Genesca M., Alfaro V., Pi F., Hotter G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia reperfusion, *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 40:992-1003.
97. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Ankara. Palme Yayıncılık; 2003.
98. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP et al. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994;269: 6765-72.
99. Ozkan M, Dweik R. Nitric Oxide and Airway Reactivity. *Clin Pulm Med* 2001;8:199-206.
100. Ozkan M, Yuksekol I. Nitrik Oksit Ve Akciğerler. *Toraks dergisi*. 2003;Nisan: 4 (1)
101. Walker L.M., Walker P.D., Imam S.Z., Ali S.F., Mayeux, P.R. Evidence for Peroxynitrite Formation in Renal Ischemia-Reperfusion Injury: Studies with the Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor L-N6-(1- Iminoethyl) lysine1, *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2000; 295:417-422.
102. Chatterjee P.K., Patel N.S.A., Kvale E.O., Cuzzocrea S., Brown P.A.J., Stewart K.N., Mota-Filipe H., Thiemermann C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury, *Kidney International* 2002; 61:862-871.
103. Burlacu A., Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins, *J. Cell. Mol. Med.* 2003; 7(3):249-257.
104. Koçtürk S., Kayatekin B.M., Resmi H., Açıkgöz O., Kaynak C., Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats *Eur. J. Appl. Physiol.* 2008; 102:515-524.

105. Philchenkov A., Caspases: potential targets for regulating cell death, *J. Cell. Mol. Med.* 2004; 8(4):432-444.
106. Gulbins E., Dreschers S., Bock J., Role of mitochondria in apoptosis, *Experimental Physiology* 2003; 88:85-90.
107. Akşit H., Bildik A., Apoptozis *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* 2008 ;19(1):55-63.
108. Kültürsay H., Kayıkçıoğlu M. Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar. *Anadolu Kardiyoloji Derg.* 2002; 4:323-9.
109. Sprick M.R., Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1644:125-132.
110. Aydoğdu N., Kaymak K., Yalçın Ö. Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri *Fırat Tıp Dergisi* 2005; 10(4); 151-155.
111. Orrenius S., Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death, *Drug Metabolism Reviews* 2007; 39:443-455.
112. Tomatır A.G., Apoptoz: Programlı hücre ölümü *T. Klin. Tıp Bilimleri* 2003, 23:499-508.
113. Shen H.M., Liu Z.G. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 40:928–939.
114. Chao C.L., Hou Y.C., Chao P.D.L., Weng C.S., Ho F.M., The antioxidant effects of quercetin metabolites on the prevention of high glucose-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells *Br. J. Nutr.* 2008; 14:1-6.
115. Ishikawa Y., Kitamura M., Anti-apoptotic effect of quercetin: Intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways, *Kidney International* 2000; 58:1078-1087.
116. Wang L.M., Tian X.F., Song Q.Y., Gao Z.M., Luo F.W., Yang C.M., Expression and role of inducible nitric oxide synthase in ischemiareperfusion liver in rats *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 2003; 2:252-258.

117. Strauss M, Hargens A, Gershuni D. Reduction of skeletal muscle necrosis using intermittent hyperbaric oxygen in a model compartment syndrome. *J Bone Joint Surg* 1983; 65A:656–662.
118. Nylander G, Nordstrom H, Lewis D, Larsson J. Metabolic effects of hyperbaric oxygen in postischemic muscle. *Plastic Reconstr Surg* 1987; 79:91-98.
119. Zamboni WA, Roth AC, Russell RCA, et al. The effect of acute hyperbaric oxygen therapy on axial pattern skin flap survival when administered during and after total ischemia. *J Reconstr Microsurg* 1989; 5:343-347.
120. Reitan JA, Kein ND, Thorup S, Corkill G. Hyperbaric oxygen increases survival following carotid ligation in gerbils. *Stroke* 1990; 21:119-123.
121. Thomas MP, Brown LA, Sponseller DR, et al. Myocardial infarct size reduction by the synergistic effect of hyperbaric oxygen and recombinant tissue plasminogen activator. *Am Heart J* 1990; 120:791-796.
122. Sirsjo A, Lehr H-A, Nolte D, et al. Hyperbaric oxygen treatment enhances the recovery of blood flow and functional capillary density in post-ischemic striated muscle. *Circ Shock* 1993; 40:9-13.
123. Sterling DL, Thornton JF, Swafford A, et al. Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo. *Circulation* 1993; 88:1931-1936.
124. Thom S. Functional inhibition of leukocyte [beta]2 integrins by hyperbaric oxygen in carbon monoxide-mediated brain injury in rats. *Toxicol Appl Pharm* 1993; 123:248-256.
125. Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, et al. Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plastic Reconstr Surg* 1993; 91:1110-1123.

126. Mink RB, Dutka AJ. Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits does not promote brain lipid peroxidation. *Crit Care Med* 1995; 23:1398-1404.
127. Nylander G, Lewis D, Nordstrom H, Larson J. Reduction of postischemic edema with hyperbaric oxygen. *Plast Reconstr Surg* 1985; 76:596-601.
128. Go LO, Murry CE, Richard VJ, et al. Myocardial neutrophil accumulation during reperfusion and reversible or irreversible ischemic injury. *Am J Physiol* 1988; 255:H1188-H1198.
129. Lucchesi BR, Werns SW, Fantone JC. The role of the neutrophil and free radicals in ischemic myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21:1241-1251.
130. Chen Q, Banick PD, Thom SR. Functional inhibition of rat polymorphonuclear leukocyte [beta]2 integrins by hyperbaric oxygen is associated with impaired cGMP synthesis. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 1996; 276:929-933.
131. Mickel HS, Vaishnav YN, Kempinski O, et al. Breathing 100% oxygen after global ischemia in mongolian gerbils results in increased lipid peroxidation and increased mortality. *Stroke* 1987; 18:426—430.
132. Thom SR. Functional inhibition of leukocyte B2 integrins by hyperbaric oxygen in carbon monoxide-mediated brain injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 123: 248-56.
133. Chen M-F, Chen H-M, Ueng SWN, Shyr M-H. Hyperbaric oxygen pretreatment attenuates hepatic reperfusion injury. *Liver* 1998; 18:110-116.
134. Kawamura S, Yasui N, Shirasawa M, et al. Therapeutic effects of hyperbaric oxygenation of acute focal cerebral ischemia in rats. *Surg Neurol* 1990; 34:101-106.

135. Takahashi M, Iwatsuki N, Katsuhiko O, et al. Hyperbaric oxygen therapy accelerates neurologic recovery after 15-minute complete global cerebral ischemia in dogs. *Crit Care Med* 1992; 20:1588-1594.
136. Thom SR, Elbaken ME. Oxygen-dependent antagonism of lipid peroxidation. *Free Rad Biol Med* 1991; 10:413-426.
137. Jain K.K., Torbati D., Tao H.Y., Ni G.T Oxygen Toxicity. In: Jain K.K. (edt): *Textbook Of Hyperbaric Medicine* 3th Ed., Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe & Huber Publishers.1999; p.65
138. Jain K.K.1999 History of Hyperbaric Medicine. In: Jain K.K. (edt): *Textbook Of Hyperbaric Medicine* 3th Ed., Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe & Huber Publishers, .1999; p.2-10
139. Hamilton-Farrell M., Bryson P., Florio J., Gough-Allen R., Grogan P., Philips N., Poole D., Tarry J. History and Research. In: Ross J.A.S. (Ed.): *The Training and Education of Hyperbaric Unit Personnel: Report of a Working Party of The British Hyperbaric Association*, Aberdeen, University of Aberdeen Printing Services 1999; p. 41
140. Eliot D., Kindwall E.P. Decompression Sickness. In: Kindwall E.P., Whelan H.T. (eds): *Hyperbaric Medicine Practice* 2nd Revised Edition, USA, Best Publishing Company 2002; p. 434
141. Kindwall E.P. History of Hyperbaric Medicine. In: Kindwall E.P., Whelan H.T. (eds): *Hyperbaric Medicine Practice* 2nd Revised Edition, USA, Best Publishing Company 2002; p.1-21
142. Bassett BE, Bennett PB. Hyperbaric oxygen therapy, preface and background. In: Davis JC, Hunt TK (ed.) *Hyperbaric Oxygen Therapy*, Maryland, Undersea Medical Society Inc. 1977; 11-24.
143. Behnke AR. A brief history of hyperbaric medicine. In: Davis JC, Hunt TK (ed.) *Hyperbaric Oxygen Therapy*, Maryland, Undersea Medical Society Inc. 1977; 27-31.
144. Kindwall E.P. The Physics of Diving and Hyperbaric Pressures. In: Kindwall E.P., Whelan H.T. (eds): *Hyperbaric Medicine Practice* 2nd Revised Edition, USA, Best Publishing Company 2002; p.25-26

145. Hammarlund C. The Physiologic Effects of Hyperbaric Oxygenation. In: Kindwall E.P., Whelan H.T. (eds): Hyperbaric Medicine Practice 2nd Revised Edition, USA, Best Publishing Company 2002; p.37-65
146. Jain K.K. Physical, Physiological, and Biochemical Aspects of Hyperbaric Oxygenation. In: Jain K.K. (edt): Textbook Of Hyperbaric Medicine 3th Ed., Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe & Huber Publishers, 1999; p.10-28
147. Tibbles PM, Edelsberg JS, Hyperbaric- oxygen therapy. N Engl J Med 1996; 334: 1642-1648.
148. Gabb G, Robin ED. Hyperbaric oxygen. A therapy in search of diseases. Chest 1987; 92: 1074-1082.
149. Leach RM, Rees PJ, Wilmschurst P. Hyperbaric oxygen therapy. BMJ. 1998; 317(7166):1140-1143.
150. Knighton DR, Halliday B, Hunt TK. Oxygen as an antibiotic. A comparison of the effects of inspired oxygen concentration and antibiotic administration on in vivo bacterial clearance. Arch Surg. 1986;121(2):191-195.
151. Hunt TK. The physiology of wound healing. Ann Emerg Med. 1988;17(12):1265-1273.
152. Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. Surgery. 1981;90(2):262-70.
153. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Uygulanan Özel Sağlık Merkezleri Hakkında Yönetmelik: Resmi Gazete. Tarih: 01.08.2001, Sayı: 24480
154. Feldmeier J.J.(2003) Hyperbaric Oxygen. Indications and Results. In: Feldmeier J.J.(edt): The Hyperbaric Oxygen Therapy Committee Report UHMS. Kensington, Maryland, 2003; 87-100
155. ECHM Reccomendations for HBOT European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine Lille 2004
156. Braun E, Fisher B, Jain KK, Lehl S, Springer C: Handbook of Hyperbaric Medicine 1998; 219-223.

157. Jain KK. Textbook of Hyperbaric Medicine-with Contributions by R. Neubauer, J.G., E.M., Caporesi-Toronto: Lewiston. Hogrefe and Huber Publishers 1990; 6769.
158. Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric-oxygen therapy. N Engl J Med. 1996; 334(25):1642-1648.
159. Kindwall E.P.: A History of Hyperbaric Medicine. In: Hyperbaric Medicine Practice. Kindwall E.P.(Ed), Best Publishing Company, Arizona, 1995; 2- 16.
160. Grim P.S., Gottlieb L.J., Boddie A., Baston E.: Hyperbaric Oxygen Therapy. Jama. 1990; 263: 2216-2220,.
161. Jain K.K.: Textbook of Hyperbaric Medicine. 2 ndi Revised Ed. 1996; 11- 12.
162. Gökben M.: Hiperbarik Oksijen Tedavisi. Anestezi Dergisi 2001; 9: 237-244,
163. Hammerlund C.: The Physiologic Effects of Hyperbaric Oxygen, In: Hyperbaric Medicine Practice Kindwall E(Ed)., Best Publishing Company, Arizona 1995; 1732.
164. Memişoğulları, R., Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 3:30-39
165. Cohn, G.H.: Hyperbaric Oxygen Therapy. Promoting Healing in Difficult Cases. Postgrad. Med. 1986; 79(2):89-92,
166. Uzun H, Kalkan M, Tunç B ve ark. Testiküler torsiyonda hiperbarik oksijen tedavisinin etkinliği. Türk Üroloji Dergisi: 2004; 30 (3): 273-278.
167. Kolski JM, Mazolewski PJ, Stephenson LL, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on testicular ischemia-reperfusion injury. J Urol. 1998;160(2): 601-604.

168. Gurer A, Ozdogan M, Gomceli I, Demirag A, et al. Hyperbaric Oxygenation Attenuates Renal Ischemia–Reperfusion Injury in Rats. *Transplantation Proceedings* 2006; 38: 3337–3340
169. Robert L. Chevalier, MD. Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy. *Current Opinion in Pediatrics* 2006; 18:153–160
170. Galat A, Robinson AV, Rhodes RS. Oxygen free radical mediated renal dysfunction. *J Surg Research* 1989; 46: 520-525.
171. Gonzalez F, Evelson P, Speziale NS, et al. Hydrogen peroxide metabolism and oxidative stress in cortical, medullary and papillary zones of rat kidney. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1157: 155-161
172. Hansson R, Johansson S, Jonsson O, et al. Kidney protection by treatment with free radical scavengers and allopurinol: Renal function at recirculation after warm ischemia in rabbits. *Clin Sci* 1986; 71: 245-251
173. Bander SJ, Buerkert JE, Martin D, Klahr S. Longterm effects of 24 hr unilateral ureteral obstruction on renal function in the rat. 1995; 28:614-620.
174. Heyman SN, Fuchs S, Jaffe R, Shina A, Ellizian L, Brezis M, Rosen S. Renal microcirculation and tissue damage during acute ureter obstruction in the rat: Effect of saline infusion, indomethacin and radiocontrast. *Kidney Int* 1997; 51:653-663.
175. Capelouto CC, Slatzman B. The pathophysiology of ureteral obstruction. *J Endourol* 1993; 7:93-103.
176. Fink RL, Caridis DT, Chemiel R, Ryan G. Renal impairment and its reversibility following variable periods of complete ureteric obstruction. *Aust NZ J Surg* 1980; 50:77-83.
177. Ryuji Ohasahi, Akira Shimizu, Yukunari Masuda, Hiroshi Kitamura, Masamichi Ishizaki, Yuichie Sugisaki, Nobuaki Yamanaka. Peritubular capillary regression during the progression of experimental obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:1795-1805.

178. Glaesson G, Josephson S, Robertson B. Experimental partial ureteral obstruction in newborn rats. Do the morphological effects progress continuously? J Urol 1983; 130:1217-22.
179. Vaughan ED, Marion D, Poppas DP, Felsen D. Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: Studies from Charlottesville to New York. J Urol 2004; 172:2563–2569.
180. Köken T, Kahraman A, Serteser M, ve ark. Hemodiyaliz ve oksidatif stres. Kocatepe Tıp Dergisi 2004; 5(Ek Sayı): 9-13
181. Schreiner GF, Harris KP, Purkerson ML, Klahr S. Immunological aspects of acute ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the kidney. Kidney Int 1988; 34:487-93.
182. Nathan CF. Secretory products of macrophages. J Clin Invest 1987; 79:319-26.
183. Harris KP, Klahr S, Schreiner G. Obstructive nephropathy. From mechanical disturbance to immune activation? Exp Nephrol 1993; 1:198-204.
184. Vinas L.J., Sola A., Genesca M., et al. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia-reperfusion, Free Radical Biology & Medicine 2006; 40:992-1003.
185. Nagle RB, Johnson ME, Jervis HR. Proliferation of renal interstitial cells following injury induced by ureteral obstruction. Lab Invest 1976; 35:18-22.
186. Chevalier RL, Smith CD, Wolstenhoime J, Krayewsky S, Reed JC. Chronic ureteral obstruction in the rat suppresses renal tubular Bcl-2 and stimulates apoptosis. Exp Nephrol 2000; 8:115-121.
187. Kaushal GP, Ueda N, Shah SV. Role of caspases (ICE/CED 3 proteases) in DNA damage and cell death in response to a mitochondrial inhibitor, antimycin A. Kidney Int 1997; 52:438-445.
188. Kaushal GP, Singh AB, Shah SV. Identification of gene family of caspases in rat kidney and altered expression in ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol 1998; 274:F587-595.

189. Wayne R. Waz, Judith B. Van Liew, and Leonard G. Feld. Nitric oxide metabolism following unilateral renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pediatr Nephrol* 1998;12:26-29.
190. Minnard E.A., Show J., Naama H. Inhibition of NO Synthesis is Detrimental during Endotoxemia. *Arch. Surg.* 1994; 129:142-145
191. Kubes P., Suzuki M., Granger D.N. Nitric Oxide: An Endogenous Modulator of Leukocyte Adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:4651-4655,
192. Lopez-Neblina F., Paez A.J., Toledo A.H., Mirmiran R. Role of Nitric Oxide in Renal Ischemia/Reperfusion in the Rat. *Circ. Shock* 1995; 44:91-96
193. Lopez-Neblina F., Paez-Rollys A.J., Toledo-Pereyra L.H.: Modulation of Neutrophil Infiltration Through Nitric Oxide in the Ischemic Rat Kidney. *Transplant. Proc.* 1995; 27:1883-1888
194. Lopez-Neblina F., Toledo-Pereyra L.H., Mirmiran R., Paez-Rollys A.J. Time Dependence of Na-Nitroprusside Administration in the Prevention of Neutrophil Infiltration in the Rat Ischemic Kidney. *Transplantation* 1996; 61:179-183
195. Aragno M., Cutrin J.C., Mastrocola R., et al. Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: Attenuation by dehydroepiandrosterone, *Kidney International*, 2003; 64:836-843.
196. Çakan, M., Çakan, T., Aydos, T., Yilmazer, D., Öğüş, E., Kılıç, A., S. Sıçan testisindeki iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan oksidatif stres ve histopatolojik değişiklikler üzerine ketoprofenin koruyucu etkisi, *Türk Üroloji Dergisi*, 2007; 33:50-55.
197. Ling H, Edelstein C, Gengaro P, Meng X, Lucis S, Knotek M, Wangsiripaisan A, Shi Y, Schrier R. Attenuation of renal Ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol* 1999; 277:F383-390.

198. Eckardt KU. Acute renal failure--more than kidney ischemia?
Wien Klin Wochenschr. 2000;112:145-148.
199. Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J.: Biochemistry of Nitric
Oxide and Its Redox-Activated Forms. Science, 1992; 258:1898-1902,
200. Wright, C.E., Rees, D.D., Moncada, S.: Protective and
Pathological Role of Nitric Oxide in Endotoxin Shock. Cardiovasc. Res.
1992; 26:48-55,
201. Kher A., Meldrum K.K., Wang M., Tsai B.M., Pitcher J.M.,
Meldrum D.R. Cellular and molecular mechanisms of sex differences in
renal ischemia-reperfusion injury Cardiovascular Research 2005;
67:594-603.
202. Kobara M, Tatsumi T., Takeda M et. al. The dual effects of nitric
oxide synthase inhibitors on ischemia reperfusion injury in rat hearts.
Basic Res Cardiol 2003; 98(5):319-28
203. Jamieson D.D. Lipid Peroxidation in Brain and Lungs From
Mice Exposed to Hyperoxia. Biochem. Pharmacol., 1991; 41 (5):749-
56,
204. Monstrey ST., Mullick P., Narayanan K., Ramasastry S.S.:
Hyperbaric Oxygen Therapy and Free Radical Production An
Experimental Study in Doxorubicin (Adriamycin) Extravasation Injuries.
Ann. Plast. Surg. 1997; 38:163-8,
205. Jenkinson S.G., Jordan J.M., Duncan OA. Effects of Selenium
Deficiency on Glutathione-induced Protection from Hyperbaric
Hyperoxia. Am. J. Physiol. 1989; 257(6/1):L393-8.
206. Jenkinson S.G., Jordan J.M., Lawrence R.A. BCNU-Induced
Protection from Hyperbaric Hyperoxia: Role of Glutathione Metabolism.
J. Appl. Physiol. 1988; 65(6):2531-6
207. Pablos M.I., Reiter R.J., Chuang J.I., et al. Acutely Administered
Melatonin Reduces Oxidative Damage in Lung and Brain induced by
Hyperbaric Oxygen. J. Appl. Physiol., 1997; 83(2):354-8,

208. Puglia OD., Loeb G.A. Influence of Rat Brain Superoxide Disinutase inhibition By Diethylthiocarbamate Upon the Rate of Development of Central Nervous System Oxygen Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984;75(2):258-64
209. Weber OA., Duncan OA., Lyons M.J., Jenkinson S.G. Depletion of Tissue Glutathione with Diethyl Maleate Enhances Hyperbaric Toxicity. *Am. J. Physiol.* 1990; 258(6/1):L308-12
210. Mader, J.T.: Hyperbaric Oxygen Therapy, A Committee Report. Undersea & Hyperbaric Medical Society Bethesda 1989.
211. Undersea & Hyperbaric Medical Society: Hyperbaric Oxygen Therapy: A Committee Report Kensington 1996.