

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

TAVŞAN MODELİNDE UNİLATERAL SUPRAVEZİKAL
OBSTRÜKSÜYONA BAĞLI GELİŞEN RENAL HÜCRE
APOPTOZİSİNİN ANALİZİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ramazan UÇAK

Tez Danışmanı: Doç.Dr. İbrahim SARI

GAZIANTEP- 2000

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

TAVŞAN MODELİNDE UNİLATERAL SUPRAVEZİKAL
OBSTRÜKSÜYONA BAĞLI GELİŞEN RENAL HÜCRE
APOPTOZİSİNİN ANALİZİ

UZMANLIK TEZİ
Dr.Ramazan UÇAK

Tez Danışmanı : Doç.Dr. İbrahim SARI

GAZIANTEP- 2000

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa numarası |
|--|----------------|
| I. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| II.GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| 1.BÖBREK EMBRİYOLOJİSİ..... | 2 |
| 2.BÖBREK ANATOMİSİ..... | 6 |
| 3.BÖBREK HİSTOLOJİSİ..... | 8 |
| 4.OBSTRÜKTİF ÜROPATİ..... | 10 |
| 5.HÜCRE ZEDELENMESİ..... | 15 |
| 6.APOPTOZİS..... | 17 |
| 7.APOPTOZİSİ BELİRLEME METODLARI VE TUNEL..... | 35 |
| III.GEREÇ VE YÖNTEM..... | 37 |
| IV.BULGULAR..... | 41 |
| V. TARTIŞMA..... | 50 |
| VI.SONUÇ..... | 58 |
| VII.ÖZET..... | 60 |
| VIII.KAYNAKLAR..... | 63 |

TEŞEKKÜR

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı' nda çalıőtığım süre içinde eğitimime olan katkılarından dolayı Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr.İbrahim Sarı ile tüm hocalarıma ve çalıőtma arkadaşlarıma teşekkür ve saygılarımı sunarım.

KISALTMALAR

- ATN : Akut tubuler nekroz
EGF : Epidermal growth factor
GFR : Glomerular filtrating rate
GVHD : Graft versus host disease
HE : Hematoksilen-Eozin
ICE : Inhibitör of converting enzyme
IFN-I γ : İnterferon-I gamma
ILN-I α : İnterleukin -I alfa
KÜO : Kısmi üreteral obstrüksüyon
NOS : Nitrik oksit sentetaz
OÜ : Obstrüktif üropati
PCNA : Proliferating cell nükleer antigen
PDGF : Platelet derived growth factor
RAS : Renin-angiotensin sistemi
TGF- β I : Transforming growth factor-beta I
TNF- α : Tümör nekrotizan faktör- alfa
TNFR : Tümör nekrotizan faktör reseptör
TUNEL : Terminal deoxytransferase-mediated bio-dUTP nick and labeling
TÜO : Tam üreteral obstrüksüyon
UÜO : Unilateral üreteral obstrüksüyon

TABLO VE ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Tablo 1 : Obstrüktif üropatinin sınıflaması

Tablo 2 : Hücre ölümü tiplerinin farklılıkları

Tablo 3 : Tam obstrüksüyon grubunda belirlenen apoptotik hücre sayısı

Tablo 4 : Kısmi obstrüksüyon grubunda belirlenen apoptotik hücre sayısı

Şekil 1 : İskemik akut renal yetmezlikte muhtemel patojenik mekanizmalar

Şekil 2 : İskemi ve reperfüzyonda membran harabiyetinin mekanizmaları

Şekil 3 : Koagülasyon nekrozu ve apoptoziste ardışık ultrastrüktürel değişiklikler

Şekil 4 : TNF-R aktivasyonu ile apoptozisin uyarılması veya NF-kB aktivasyonu ile hücre yaşamının devamı

Şekil 5 : Fas-apoptozis etkileşiminde muhtemel model

Şekil 6 : Apoptoziste bcl-2'nin etkileri ve mitokondriyal mekanizma

Şekil 7 : Apoptozisin moleküler seviyede şematik özeti

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 1: Tam obstrüksüyon sonrası böbrek dokusunda fibrozis, inflamasyon, damar duvarlarında kalınlaşma ve tubuler atrofi (HE, X 40)

Resim 2 : Tam obstrüksüyon sonrası böbrek dokusunda, tubuluslarda kistik genişlemeler, atrofi bulguları ile interstisyel fibrozis (HE, X 40)

Resim 3 : Tam obstrüksüyon sonrası tubulus epitelinde vakuoler dejenerasyon, atrofi ve interstisyel fibrozis (HE, X 100)

Resim 4 : Kısmi obstrüksüyon sonrası tubulus epitelinde vakuoler değişiklikler (HE, X 40)

Resim 5 : Kısmi obstrüksüyon sonrası tubulus epitelinde vakuoler değişiklikler, hiperemi (HE, X 100)

Resim 6 : Tam obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli nükleer boyanma gösteren, seyrek gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X 100)

Resim 7 : Tam obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli nükleer boyanma gösteren, sık gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X 40)

Resim 8 : Tam obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli nükleer boyanma gösteren, sık gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X100)

Resim 9 : Kısmi obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli nükleer boyanma gösteren, seyrek gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X 40)

Resim 10 : Kısmi obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli nükleer boyanma gösteren, sık gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X 40)

Resim 11 : Kısmi obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli nükleer boyanma gösteren, sık gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X 100)

GİRİŞ VE AMAÇ

Apoptozis, özel bir hücre ölüm şekli olup, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir. Organogenesis ve doku büyümesi sırasında gelişebileceği gibi, patolojik uyarılar tarafından da indüklenir. İlk olarak 1972 yılında Avusturyalı patolog John Kerr tarafından tanımlanmıştır. Apoptozis morfolojik bir terim olup, "programlı hücre ölümü" olarak anılmaktadır.

Birçok fizyolojik ve patolojik olayda rolü gösterilmiş olan apoptozis, son yıllarda üzerinde birçok araştırmanın yapıldığı genetik bir olaydır. Gerek hücre zedelenmesinde, gerek tümör patogenezinde, gerekse de birtakım fizyolojik süreçlerde yer alması, apoptozisi ve buna yol açan mekanizmaları derinlemesine araştırmak ihtiyacına yol açmıştır. Bu amaçla da birçok organda gerek deneysel olarak, gerekse de insanda oluşan hastalıkların mekanizmalarında, ne tür bir rolü olduğu araştırılmıştır.

Böbrek obstrüksiyonu ile oluşan doku beslenmesinin bozulması da önemli problemlerden birisidir. Akut veya kronik bir obstrüksiyon sebebi sonucu böbreklerde hafif veya ileri derecede oluşan harabiyetin ve hücre zedelenmesinin, geri dönüşümlü olup olamayacağı, apoptozisinde bu süreçte aldığı rol çok sayıda araştırmada irdelenmiştir. Ayrıca deneysel olarak yapılan birçok çalışma da böbrek te kısmi ve/veya tam obstrüksiyon sonrası oluşan apoptotik hücre yoğunluğundaki farklılıklar araştırılmıştır.

Bu bilgiler ışığında, apoptotik hücreleri göstermede yeni, duyarlılığı ve özgünlüğü çok iyi bir teknik olan **terminal deoxytransferase-mediated bio-dUTP nick and labeling (TUNEL)** metodu kullanılarak, kısmi ve tam böbrek obstrüksiyonunda apoptotik hücre sayısında anlamlı bir farklılık olup olmadığının tespiti amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

BÖBREK EMBRİYOLOJİSİ

İnsanda kalıcı böbrek birbiri ardından ortaya çıkan 3 taslak ile oluşur:

- 1)Pronefroz
- 2)Mezonefroz
- 3)Metanefroz

Pronefroz:

3. haftada boyun bölgesindeki ürogenital plaklarda pronefroz kanalcıkları bir hücre tomurcuklanması ile ortaya çıkar. Bu tomurcuklar önce dorsale doğru büyür ve sonra kör bir uçla kuyruk yönünde kıvrılır. Aşağıya doğru uzayan yapı kendinden sonra gelen ürogenital plağın yaptığı aynı biçimdeki tomurcukla birleşir. Bu olay segment segment tekrarlanarak neticede bir kordon oluşur. Daha sonra kordon içinde lümen belirmesi ile pronefroz veya Wolf kanalı ortaya çıkar. Aşağıya doğru inen kanal kloakaya açılır. Pronefroz nefronunun oluşması ile nefrotomun serbest kalan dorsal parçasında Bowman kapsülü oluşur. Sonra kapsül içine damarların girmesi ile glomerül, korpuskulum renale ortaya çıkar. Ventral parçası ise coelom boşluğuna huni gibi kanalla bağlanır.

İnsanda pronefroz tam olarak oluşmaz, son 2-4 segmentinde nefronlar tipik olarak ortaya çıkarken, üstte ilk oluşanlar ise çabuk körelir. Bu arada birçok segmentte oldukça büyük glomerüllerde oluşabilir. 4.hafta sonunda pronefrozun büyük bölümü körelirken bu yapıdan sadece Wolf kanalı arta kalır.

Mezonefroz:

Rudimenter pronefrozun alt ucunda 4. haftada ortaya çıkan mezonefroz taslağı 7. boyun segmentinden 4.lumbal segmente kadar uzanır. Pronefrozun atrofiye olmasıyla birlikte mezonefrozun gelişmesi başlar.

Mezonefroz kanalcıkları birbiri ardına sıralanmış solid hücre yığınları halinde mesonefrojen blastemden meydana gelir. Mezonefrojen blastemden oluşan mezonefroz kürelerinin içi çok çabuk boşalarak mesonefroz keseciklerine dönüşür. Her keseciğin Wolf kanalına bakan tarafında kanalın indüksiyonu ile bir tomurcuk belirir. Bu tomurcuklar pronefroz kanalına doğru uzanır ve onunla birleşir. Çok kısa süre sonra uzayıp kıvrılmalar gösteren bu yapıda lümenleşme görülür. Pronefroz kanalı ile bağlantıdan hemen sonra mezonefroz kesecikleri büyür. Herbiri serbest ucundan başlayarak Bowman kapsülü, esas parça, orta parça, nihayet toplayıcı boruları yaparak Wolf kanalına açılır. Bowman kapsülleri içine bu andan itibaren aortun yan dallarından biri girer ve glomerül oluşur. Mezonefroz 2. ayın ortasında en büyük hacmine erişir. Böylece aşağı yukarı 15 segmentli bir bölgeyi kaplar. Bu arada mezonefrozun radiks mezenterinin solunda yaptığı kabartılar plika mesonefrikaları oluşturur. Ayrıca mezonefrozun iç yanında gelişmekte olan gonad taslaklarının yaptığı 2. bir kabartıdanda plika genitalis gelişir. Her iki yapı ürogenital kristayı oluşturur. Gonad ve mesonefroz taslakları karın arka duvarına mezenterium ürogenitale ile asılıdır. Kısa süre içinde mezonefrozun yukarı ucundan başlayan körelme çok çabuk olarak aşağıya doğru devam eder. Böylece 3. ayın başlangıcından itibaren mezonefrozun 7. boyun segmentinden 1.lumbal segmente kadar olan bölümü körelerek 5/6'sı ortadan kalkar, geri kalan 1/6 parçası genital organların yapısına iştirak etmek üzere varlığını sürdürür. Bu yapının üst ucu epigenitalis, alt ucu da paragenitalisi yapar. Pronefroza ait ortaya çıkan ve mezonefrozdada varlığını sürdüren Wolf kanalının alt bölümünden daha sonra heriki cinste ureter tomurcuğu gelişir.

Metanefroz:

Beşinci haftadan itibaren mesonefrozun gerilemesiyle kalıcı böbreği oluşturacak metanefroz gelişmeye başlar. Metanefroz yapı materyalini 2 ayrı yerden alır:

1) Üreter tomurcuğu:

Wolf kanalından köken alan bu bölümde üreter, pelvis renalis, kaliks renalis ve toplayıcı borular oluşur.

2) Metanefrojen blastem:

Bu oluşumdan ise nefron (Bowman kapsülü ve tubuluslar) oluşur. Dördüncü hafta içinde Wolf kanalının arka duvarında ve kanalın kloakaya açıldığı yerin biraz üstünde çıkıntı halinde üreter tomurcuğu ortaya çıkar. Üreter tomurcuğu arkaya ve yukarıya doğru yükselerek metanefrojen blasteme ulaşır ve ona yaptığı indüksiyonla metanefrojen blastemle her yönden sarılır. Bu arada üreter tomurcuğu çok çabuk yayılarak 2 tarafı oldukça basık kısa saplı bir kese biçimine dönüşür. Bu bölüm propelvis yani pelvis renalisin ilk taslağıdır. Gittikçe genişleyen propelvis önce biri üst, diğeri alt 2 çıkıntı oluşturur. Kısa süre sonrada dorsal ve ventral yüzde de beliren ikişer çıkıntı ile duktus renkularis oluşur. Bunlarda ileride kaliks renalis majorisi oluşturur. Duktus renkularisler metanefrojen blastem içinde yeniden çatallanarak herbiri 2 yeni tomurcuk yapar ve sekonder idrar tomurcuklarını oluşturur. Yeni tomurcukların çatallanması 12 kuşak kadar sürer. Bu arada 5. ayın sonuna doğru uçta oluşan çatallanmalar ile devamlı olarak yeni kanalcıklar oluşurken ilk ortaya çıkan sekonder kanalcıkların 3-4 kuşağı genişleyerek kaliks renalisleri yaparlar. Bu durumda toplayıcı borular doğrudan doğruya buraya açılır. Daha sonrada toplayıcı borular uzayarak, kaliks renalis minorislerin papillasını oluşturur.

NEFRON

Metanefrozun nefronu mezonefrozdakine benzer biçimde gelişir. Üreter tomurcuğunun çatallanmasına uygun olarak metanefrojen blastemde devamlı olarak

çoğalırken aynı zamanda her yeni çatallanma ile oluşan toplayıcı boruların uç bölümüne şapka gibi oturur. Bir süre sonra metanefrojen blastemin toplayıcı boruların üstüne yerleşen bu küçük paraçasından ayrılan hücre yığınları toplayıcı dalcığın uç bölümünün sağ ve sol kenarına yerleşir. Bir süre sonra da hücre yığınları farklılaşarak ufak keseciklere dönüşür. Keseciklerin ucu toplayıcı borulara doğru uzanırken serbest ucu da ileriye doğru uzanır. Serbest uç bir süre sonra içeriye doğru bir çöküntü yaparak Bowman kapsülünün ilk taslağını oluşturur. Diğer uç ise toplayıcı boru ile birleşir. Önceleri bu birleşme yerinde epitelyal bir zar varsa da daha sonra yırtılır. Serbest uçta bulunan Bowman kapsülü içine arter girerken kapsül iç yaprağına ait hücrelerin bazıları dökülür ve hücreler arasında boşluklar oluşur. Diğer taraftan arta kalan hücrelerin gövdesinden bu boşluklara doğru uzanan çıkıntılar birbiri arasına girerek kapiller bazal membranı üzerine otururlar. Özelleşen bu hücreler podositlerdir. Kapsül dış yaprağı ise erkenden yassı epitel haline dönüşür. Kanalin toplayıcı boru ile birleşen ucu ise büyümesine devam eder. Ancak bulunduğu yer dar olduğundan zorunlu kıvrılmalar yaparak uzar ve tubulusun tümünü oluşturur. Yeni nefronlar ortaya çıktıkça ilk oluşanlar aşağıda pelvise yakın bölümlerde kalır. Bundan dolayı medulla sınırından itibaren nefronların ortaya çıkışı kortekse doğru birbirine paralel tabakalar halinde olur. Gelişimini tamamlayan böbrekte birbiri üzerine paralel tabakalar halinde dizilen nefronların en eskisi pelvis renalise, en yenileride böbrek yüzeyine yakın olanlardır. Doğumla birlikte bir böbrekte bir milyon, altı aylık çocukta 1.6 milyon, 7. Yaşta 1.5 milyon, 50 yaşında 1.3 milyon kadar nefron bulunur. Embryoda ve fetal hayatın bir bölümünde böbrek yüzü, renkulusların sınırları belli olduğundan loblu bir görünümdeydir. Sonradan bu belirli aralıklar korteks materyali ile dolar ve sınırları tamamen kaybolur. Kalıcı böbrek başlangıçta pelviste bulunur. Birinci aydan sonra yukarıya doğru yükselir. Fetal hayatın ilk yarısında lumbal omurlar hizasındadır. Daha sonra 11. kaburga hizasına kadar yükselir. Ancak yeniden inmeye başlar ve 5.lumbal omuruna kadar gelir. Böbreğin bu şekilde yükselişi ve inişi memelilere özgü bir durumdur. Bazen böbrek yukarıya doğru çıkamaz, pelvis içinde yerleşmiş olarak kalır. Bu duruma bağlı olarak arteria renalis, arteria iliaca internadan çıkar. Sol böbrek, sağ böbreğe göre daha çabuk ve kuvvetli olarak büyür. Sağ böbrek ise soldakine göre daha yukarı çıkar. Böbrek embriyonal

hayatın 2. evresinde işlevini tamamlar. Böylece normal koşullarda intrauterin yaşam boyunca idrar, devamlı olarak amnion sıvısına verilirken bu sıvı tekrar embriyo tarafından yutulur. Bunun sonucu doğuma doğru idrar kesesi tamamen dolar ve doğumdan hemen sonra da boşalır (1,2).

BÖBREK ANATOMİSİ

Sağ böbrek üstte surrenal, önde karaciğer ve hilum yakınlarında duodenum ile Vena Cava Inferior, altta kolonla komşuluk eder. Sol böbrek üstte surrenal, üst dışta dalak, hilum dolayında pankreas kuyruğu, ön üstte mide, altta jejunum ve kolonla komşudur. Her iki böbrek arkada diyafragma, quadratus lumborum kası ve psoas kasına bitişiktir. Böbrek peritonla karaciğerden ayrılır. Parietal peritonla perirenal fascia sağ böbreğin üst polünde kalınlaşır, hepatorenal ligamenti oluşturur. Sol böbrek dalakla olan komşuluğunda peritonla perirenal fascia kalınlaşır. Splenorenal ligamenti oluşturur. Tüm bu ligamentler avaskülerdir.

Renal hilumda önden arkaya doğru renal ven, renal arter, pelvis renalis vardır. Renal pelvis 5-7 ml kapasiteli konik bir yapıdadır. Pelvis 2-3 ana majör kalikse, bunlarda papillalarda sonlanan birçok minor kalikse ayrılır. Kaliks boynu infundibulum olarak adlandırılır. Pelvis kimi zaman tümüyle böbrek sinüsünün içindedir (intrarenal). Kimi zamanda kalikslerin uzun olması nedeniyle tümüyle böbrek dışındadır (ekstrarenal).

Böbrek parankimi korteks ve medulla olmak üzere 2 bölümdür. Medulla 8-18 adet çizgi görünümlü piramitten oluşur. Piramitlerin tabanı kortekse bakar. Tepeleri papilla adını alır ve minor kalikslere açılır. Papilla yüzeyine 7 ana kollektor kanal açılır (Bellini kanalları) ve bu görünüm nedeniyle area kribroza adını alır. Piramidlerin tabanından korteks içine doğru çizgiler uzanır (stria medullaris kurtis-ferrian uzantıları). Renal piramidlerin kesit yüzü birbirine paralel seyreden Henle kolları, kollektör kanallar ve vasa rectalar nedeniyle çizgi görünümündedir.

ARTER SİSTEMİ :

Varyasyonların çokluğu nedeniyle vasküler yapıda kesin bir standart yoktur. %70 aortadan tek sağ ve tek sol renal arter olarak çıkar. Aksesuar renal arter olasılığı %30 dur. Bunlar ana arterin alt yada üstünde ona paralel seyrederek hiluma girerler. L2 seviyesinde renal arter ve ven, aort ve vena cava inferiordan (VCI) çıkarlar.

Sağ renal arter daha uzundur ve VCI çaprazlar. Renal arter üstte adrenele A.suprarenalis inferior dalını verir. Ayrıca renal kapsüle ufak dallar verir. Renal arter %75-80 dallarını arterin 1/3 distalinde yada renal sinüste verir.

Segmental arterler şunlardır; A.segmentalis superior, anterior superior, anterior inferior, inferior, posterior. Bunlar böbreği 5 vasküler bölüme ayırırlar. Segmental arterler arasında anastomoz yoktur. Segmental arterler her piramid için lobar arter olarak devam eder ve bunlar 2-3 interlober artere ayrılıp piramidler arasında devam eder. Kortikomedullar bölgede interlober arterler piramid tabanına paralel seyrederek arkuat arter adını alır. Arkuat arterden birçok interlobuler arter çıkar. Bir piramidin arkuat arteri ve interlobuler arteriyle diğer piramidinkiler arasında anastomoz yoktur.

İnterlobular arterler dik olarak kortekse doğru uzanırlar. İnterlobuler arterlerin ana dalları afferent glomeruler arteriolu oluşturur ve bunlar bir yada çok sayıda glomerüle dağılırlar. Glomerüler kapiller yumağı oluştuktan sonra çıkan efferent arteriol peritubular ağ yaparak proksimal ve distal tubulu sarar. Bu kapiller pleksus venöz kapillerle birleşerek interlobuler venlere dökülür. Medullanın beslenmesini vasa rektalar sağlar. Bunların çoğu jukstaglomerüler yapıların efferent arteriolünden (Vasa rekta spuriae) az bir kısımda arkuat yada interlobuler arterlerden doğrudan çıkar (Vasa rekta vereae). Bunlar iskemik yada toksik olaylarda kısa devre yaparak medullayı korurlar.

VEN SİSTEMİ :

İnter lobuler venler arkuat venlere dökülür. Arter sisteminin aksine arkuat venler arasında anastomoz vardır. Arkuat venler interlober venlere açılır ve bunlar ana dalları sonuçta renal veni oluştururlar. İnterlobuler venler, supkapsüler venöz pleksusu sağlarlar.

Böbrek ve çevresinde 3 lenfatik sistem vardır. Büyük pleksus parankimde renal kolumnalarda damarları takip eder ve renal sinusta birçok lenfatik trunkus yapar. Supkapsüler pleksus kapsül altını drene eder ve hilumda diğer pleksus ile birleşir. Perinefritik pleksus ise supkapsüler pleksus ile bağlantılı ancak bağımsız olarak küçük kanallarla lateral aortik nodullara açılır (3).

BÖBREK HİSTOLOJİSİ

Böbrek histolojisini şematik olarak toparlayacak olursak esasen şu yapıları içerdiği söylenebilir:

- 1-Glomerül
- 2-Jukstaglomerüler apparatus
- 3-Proksimal tubul
- 4-Henlenin ince kulpu
- 5-Distal tubul
- 6-Birleştirici tubul
- 7-Toplayıcı kanal
- 8-Ara madde
- 9-Damar yapıları
- 10-Lenfatikler
- 11-Sinir kompleksi

Böbrek yüzeyi kapsül ile örtülmüş olup, bu kapsül dışta fibröz kapsül, içte bu fibröz kapsül altındaki ince kapsül olmak üzere 2 tabakalıdır. Böbrekte esas olarak 2 ayrı bölge gözlenir:

- 1) Korteks
- 2) Medulla

Korteks, içindeki meduller çizgilenmelerin, korteks içinde düz çizgiler halinde ilerlemesiyle ve bunlar arasında kıvrıntılı bir bölgenin bulunuşu nedeniyle 2 farklı yapıdadır. Medulla tabakası ise dış ve iç bölge halinde piramitte 2 kısım olarak izlenir. Loblar arası bölme niteliğindeki tubulus demetleride "Bertini" kolumnaları diye adlandırılır.

Böbrekteki en küçük fonksiyonel birim olan nefron; malpighi cisimciği ve tubuluslardan oluşur; Malpighi cisimciği glomerül ve Bowman kapsülünden oluşur. Bowman kapsülü ise 2 yapraktan oluşur; Visseral ve parietal laminalar. Arada Bowman boşluğu mevcuttur. Visseral yaprak, kapiller ağ ile yakın ilişkide olup, podositlerden (ayaksı çıkıntı) kurulmuştur. Parietal yaprak yassı epitel halinde kapsülün dış yaprağını oluşturur. Bir böbrek cisimciğinde 2 kutup dikkati çeker, damar kutbu ve bunun karşısına rastlayan bölge, idrar kutbudur. Böbrek glomerülünü oluşturan kapillerin duvar yapısındaki endotel pencere tipindedir. Bu fenestraların bir bölümü diyaframlı, bir kısmı ise geniş porus niteliğindedir. Glomerül bazal membranında ise üç tabaka mevcuttur. Ortada lamina densa, iki tarafında lamina rara interna (kapiller endotel altına gelen kısım) ve eksterna (visseral epitel altına gelen kısım) yer alır.

Jukstaglomerüler apparatus, nefronda damar kutbu kontrol mekanizması niteliğinde biraraya gelmiş yapılardan oluşur. Bunlar; arteriolo afferens duvarında epiteloid hücreler, makula densa, afferent ve efferent arteriol açısı içinde yerleşen hücre grubu (Lacis hücreleri) dur.

Bu hücreler ekstraglomerüler mezangium hücreleri olarak ta tanımlanır. Glomerül içi mezanşial hücreler ile ilişkide olduğu düşünülmektedir.

Tubuluslar 4 ana parçaya ayrılır: Proksimal tubulus, henle kulpu, distal tubulus ve kollektör tubulus.

Proksimal tubulun iki kısmı vardır: Pars convolute ve pars recta.

Pars convolute, nefronun en uzun bölümüdür. Kıvrımlı olup, glomerül yanındaki kesitlerin çoğunluğu bu tubuluslara aittir. Tubulus duvarındaki tek katlı piramidal şekilli hücreler, lümen tarafında fırçamsı kenarlı veya mikrovillilidir. Ayrıca, bu hücrelerin bazal yüzeylerinde plazma membranları kıvrımlı bir bazal labirent oluşturmuştur. Proksimal tubulus epitel hücreleri lateral yüzleri ile de sıkı bağlantılar

yapar. Böylece gerektiğinde bazalde ve lateralde intersellüler kompartımanlarda genişlemeler sağlarlar. Proksimal tubulün bu özel yapısı, filtratın %80-85 geri reabsorpsiyonunu sağlar. Tubulüs hücreleri pinositoz ile proteinlerin alınışını gerçekleştirir. Proksimal tubulus hücreleri, yuvarlak nükleusları ve bazalde labirent arasında sıralar oluşturan uzun krista tipli mitokondri yapıları ile dikkati çeker. Supranükleer golgi kompleksi ile peroksizomlar bulunur. Peroksizomlar hidrojen peroksidaz metabolizması ile ilgili enzim içerirler. Proksimal tubulusler rezerpsiyonun yanında, bazı sekresyon aktiviteside gösterirler.

Pars rekta, esas parçanın medullayı geçen kısmı olup, Henle kulpu'nun ince koluna kadar devam eder. Hücreler, proksimal kıvrımlı kısımına benzer, ancak biraz daha alçaktır.

Henle kulpu, inen ince kısmı 20-40 mikron çaplı olup, incelmış yassı epitelle döşelidir. Çıkan kalın kısmı ise distal tubulusa geçiş parçasıdır.

Distal tubulus, yüzeyinde az sayıda mikrovillus içeren ve lümene bakan prizmatik epitelle döşelidir ve fırçası kenar taşımaz. Bazal labirent mevcuttur ancak proksimal tubulusa nazaran daha az kıvrımlı yapıdadır.

Birleştirici tubulus ise nefronu toplayıcı sisteme bağlar, prizmatik epitel toplayıcı kanal epiteli halinde devam eder.

Toplayıcı kanallar farklı korteks bölgelerinden başlayan, böbreğin toplayıcı sistemidir. Kortikal ve medüller toplayıcı kanalların epitelinde açık ve koyu hücre tipleri ayırt edilirken, medüller toplayıcı kanallarda epitel yükselmeye başlar (3-6).

OBSTRÜKTİF ÜROPATİ

Normal idrar akımının engellenmesiyle ortaya çıkan yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin tümüne verilen bir tanımlamadır. Obstrüksiyon, üretral meatustan böbrek tubuluslarına kadar uzanan geniş bir alanın herhangi bir yerinde olabilir. Obstrüksiyonun şiddeti, seviyesi, süresi ve beraberinde mevcut olan enfeksiyon oldukça önemlidir. İnfravezikal obstrüksiyonlarda genelde üriner sistemin bilateral etkilenmesi ve kronik böbrek yetmezliğini doğurabilecek ileri sonuçlar söz konusu

iken, supravezikal obstrüksiyonlarda daha ziyade tek taraflı böbrek kaybı ile sonuçlanır.

Obstrüksiyon sistemin proksimalini etkileyerek üriner staz ve basınç yükselmesine neden olur. Basınç kan akımını azaltarak hücrel atrofi ve nekroza yol açar. Üriner dilusyon dışındaki tüm böbrek fonksiyonları progresif olarak azalır. Obstrüksiyonun derecesi ve süresinin uzaması böbrekte doku destrüksiyonuna yol açar. İlk sistematik bilimsel çalışmalar 1900' lü yılların başında Frank Hinmann tarafından başlatılmıştır. 1919 yılında yapılan hayvan deneylerinde unilateral obstrüksiyonun birinci haftada patofizyolojik değişikliklere yol açtığı ve 60 gün sonucunda bile kısmi histolojik düzelmelerin olabileceği gösterilmiştir.

Olayı algoritmik bir sistemde analiz edebilmek için değişik sınıflamalar yapılmaktadır (**Tablo 1**).

TABLO 1 : Obstrüktif üropatinin sınıflandırılması

| | | |
|---------------|--------------|--------------|
| NEDEN | Konjenital | Akkiz |
| SÜRE | Akut | Kronik |
| DERECE | Komplet | İnkomplet |
| SEVIYE | İnfravezikal | Supravezikal |
| ETKİLENME | Unilateral | Bilateral |
| ETKİNİN OLUŞU | Ekstresek | İntresek |
| | | Intraluminal |

Supravezikal obstrüksiyonların analizini daha çok intresek ve ekstresek sebebe göre yapmak uygun görülmektedir. İntresek nedenleride; intraluminal ve intramural olarak ayırmakta yarar vardır. Genç erkeklerdeki intraluminal obstrüksiyonun en sık nedeni üriner sistem taş hastalığıdır.

Obstrüksiyonun intramural nedenleri ise fonksiyonel ve anatomik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Fonksiyonel bozukluklar ise daha çok nöromuskülerdir. Vezikoüreterel reflü ve adinamik üreteral segmente bağlı olanlar buna örnektir.

Obstrüktif üropati yapan ekstresek sebeplerde obstrüksiyonun orijinine göre sınıflandırılabilir. Ekstresek lezyonların çoğunluğu reproduktif sistemden orijinlidir. Hamilelik en sık görülen sebebi olup, sağ üreter daha sıklıkla etkilenir (7-9).

ETYOLOJİ :

Üriner sistem obstrüksiyonlarının etyolojik analizinin, konjenital ve akkiz olarak iki grupta ve diğer sınıflamaların eşliğinde yapılması uygundur.

Konjenital anomaliler üriner sistemde diğer organ ve sistemlere nazaran daha sık görülür. Bunlar daha çok erken yaşta üriner obstrüksiyon nedenidir. Sıklıkla kronik inkomplet obstrüksiyona yol açarlar. Ancak sonradan eklenen enfeksiyon ve gelişen kingler veya ödem bu durumu akut komplet obstrüksiyona dönüştürebilir (7-9).

BÖBREKLERDE DOĞMALIK OBSTRÜKSÜYON YAPAN NEDENLER :

- 1-Böbrek taşları
- 2-Gros hematüriye bağlı kan pıhtıları
- 3-Renal papiller nekroz,
- 4-Pelvis renalis tümörü
- 5-Intratübüler kristal depozisyonu

Üriner obstrüksiyon tüm yaş gruplarında oldukça sık karşılaşılan bir antitedir. Post mortem çalışmalarda hidronefroz insidansı %3.5-3.8 oranında ve her iki sekste eşit dağılımda bulunmuştur. Çocuklarda yapılan otopsilerde %2' sinde hidronefroz tespit edilmiştir. Üriner sistem taş hastalığı en sık görülen obstrüksiyon nedenidir. Erkeklerde kadınlara nazaran üç kat daha fazla görülür. İleri yaş grubunda ise BPH ve prostat karsinomuna bağlı olarak erkek sekste insidans belirgin olarak artar (7-9).

OBSTRÜKTİF NEFROPATİ ve İSKEMİDE PATOLOJİK BULGULAR

Obstrüktif nefropatide interstisyel fibrozis, atrofi ve progresif interstisyel lökosit infiltrasyonu gelişir. Bu renal gelişim ve büyümeyi, böbrek maturasyonunu etkiler. UÜO' a bağlı kronik obstrüktif nefropatide karakteristik fonksiyonel ve yapısal değişiklikler gözlenir. Üreteral obstrüksiyon sonrası ilk birkaç günde GFR'da ve renal kan akımında azalma, interstisyel ödem, lökosit infiltrasyonu görülür. Zaman uzadıkça hidronefroz ve doku kaybı gelişir, belirgin tubuler atrofi, interstisyel fibrozis

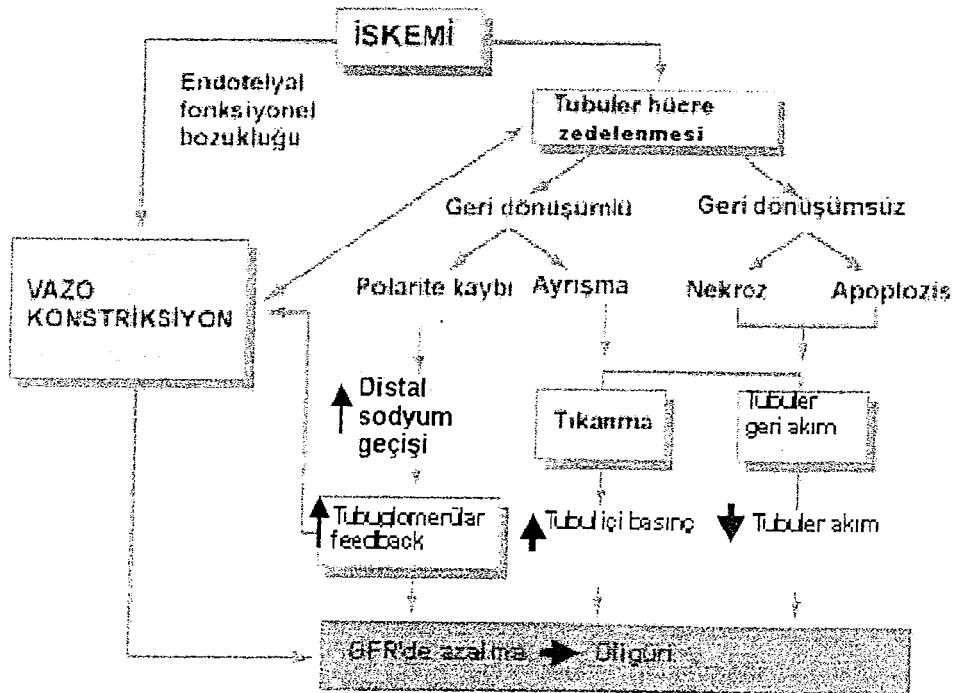
ve interstisyel inflamasyon oluşur. Ancak bu değişikliklerin patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Başlangıçtaki çalışmalarda bu değişiklikler arteriolar vazokonstrüksiyona, daha sonraki çalışmalarda ise lokal olarak sentez edilen sitokinlere bağlanmıştır. Bir görüşe göre hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucu bu değişiklikler oluşmaktadır. Renal hücre ölümü nekroz veya apoptozisle olur. Renal akut tubuler nekrozda olduğu gibi, nekrozun baskın olduğu olaylarda normal böbrekteki hücre ölümü ve renal hastalığındaki hücre kaybı apoptozis sonucu meydana gelir. En önemli gözlemlerden birisi tubuler hücre apoptozisi ile tubuler hücre proliferasyonunun paralel seyretmesidir. Apoptotik değişiklikler genelde tubuluslarda olmaktadır, glomerüller bu olaydan pek etkilenmemektedir. Apoptotik hücreler, proksimal tubuluslarda daha fazla olmak üzere distal tubuluslar ve toplayıcı kanallarda da izlenmektedir (10-14).

Renal hipoperfüzyonda tubuler ve endotelial hücre harabiyeti ve tamirini içeren adaptif yanıt görülür. Bu süreçte morfolojik değişikliklerin spektrumu geniştir; atrofi, fokal nekroz, epitelyal rejenerasyon, apoptozis, inflamasyon, interstisyel fibrozis ve trombozis. En şiddetli harabiyet normal dolaşımın özelliğinden dolayı dış medulla tabakasında görülmektedir. Renal iskeminin en belirgin etkileri tubuluslarda görülür, tubuler epitelyal hücreler yüksek oranda transport aktivitesinden sorumludur. Bu işlev mitokondrial fonksiyonla desteklenmektedir. Oksijen azalması mitokondrial fonksiyonu şiddetli olarak etkiler (13).

Tubuler harabiyetin mekanizması konusundaki yoğun çalışmalar epitelyal hücre kaybında 3 mekanizmayı öne çıkarmıştır: nekroz, hücre bütünlüğünün kaybı ve apoptozis (11,13). İskeminin yaygın bulgusu tubuler bazal membran rüptürüdür. Nefron tutulumu olasılıkla daha sonra gelir. Daha sonrada çevrede lokal inflamatuvar yanıt oluşur. Akut renal iskemi sonrası oksijen metabolitlerine maruz kalan dokuda, apoptozis te stimule olmaktadır. Apoptoziste olayın ve fagositik mekanizmanın hızlı olması inflamatuvar veya fibrotik yanıtı neden olmamaktadır. Sonuç olarak renal iskemiye bağlı zedelenmede tubuluslar ve kan damarları esas hedeflerdir ve genellikle en şiddetli dış medullada gözlenmektedir (13).

Kronik renal iskemideki atrofi mekanizması tam aydınlatılamamıştır. Tubuler atrofi tubuler epitelyal hücrelerin kaybı veya küçülmesiyle olmaktadır. Apoptozis

progresif iskemik atrofide olası bir mekanizmadır (10-14). İskemik akut renal yetmezlikte, sadece hücre ölümü (nekroz veya apoptozis) değil, geri dönüşümlü fonksiyon kaybına neden olan hücre zedelenmeleride izlenmektedir. İskemi veya hipoksi sırasında oluşan renal tubuler hücre zedelenmesinin patofizyolojisinde, intrasellüler kalsiyum, kalsiyum bağımlı enzim Calpain, Fosfolipaz –A2 ve nitrik oksit sentetaz (NOS)'ın rolü tanımlanmıştır (13,14). İnsanda renal tubuler hücre hasarı subletaldir, sıklıkla da hücrelerde vakuolüzyasyon ve şişme, hücre yüzey değişiklikleri ve hücre kaybı görülür. Akut renal yetmezlikteki oliguri, tubuler obstrüksiyona patofizyolojik olarak önemli bir kanıttır. Erken dönemdeki çalışmalarda iskemiyin ilk saatinde proksimal tubuler basınçtaki dramatik artış gösterilmiştir (14). Sonuç olarak atrofi, kronik renal iskemilerde yaygın bir bulgudur. Tubuler hücre kaybında apoptozis rol almakla birlikte iskemik nekroz ve hiperplastik rejenerasyon sonrasında homeostatik bir mekanizma olarak öne sürülmektedir (10-14). Şekil 1' de iskemik akut renal yetmezlikte muhtemel patojenik mekanizmaların özeti verilmiştir.



Şekil 1 : İskemik akut renal yetmezlikte muhtemel patojenik mekanizmalar (Robbins, Pathologic Basis of Disease)

HÜCRE ZEDELLENMESİ

Hücre, yapısı ve fonksiyonu, metabolizması, farklılaşması ve özelleşmesiyle, genetik programıyla muazzam bir işletme olarak düşünülebilir. Ne varki hücre, dışarıdan veya içeriden fizyolojik veya patolojik uyarılarca etkilenmektedir. Bu uyarıların şiddeti ve süresi hücrenin adaptasyon süresini aşarsa hücre zedelenmesi ve hücre ölümü gelişir. Hücre zedelenmesine yol açan nedenleri şöyle sıralayabiliriz:

- 1-Oksijen azalması
- 2-Fiziksel etkenler
- 3-İnfeksiyöz etkenler
- 4-İmmünolojik reaksiyonlar
- 5-Genetik bozukluklar
- 6-Beslenme bozuklukları

Bu uyarılara karşın hücre kendisini korumak ve işlevlerini sürdürmek için bir takım düzenlemeler yapar, bunlar bir zincirin halkaları gibidir;

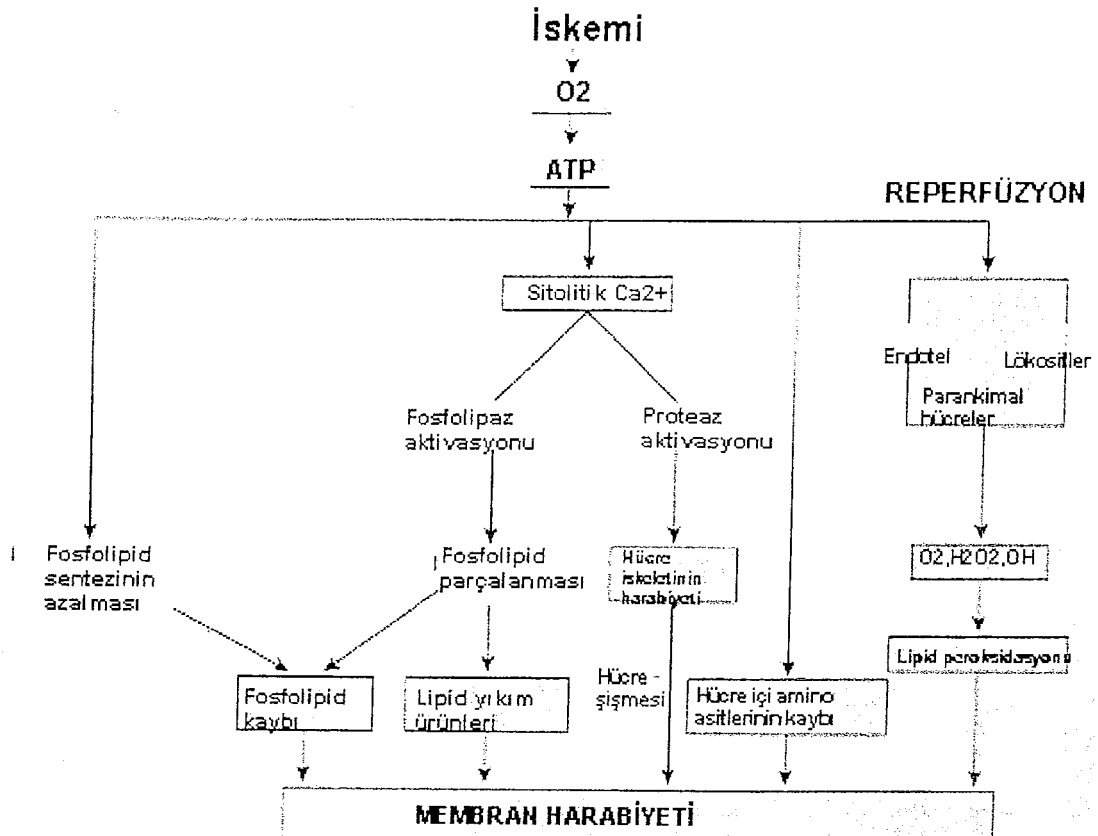
- 1-Adaptasyon (Hipertrofi, atrofi)
- 2-Geri dönüşümlü zedelenme
- 3-Geri dönüşümsüz zedelenme
- 4-Hücre ölümü (Nekroz yada apoptozis)

Normal hücre, adaptif hücre, zedelenmiş hücre, geri dönüşümsüz zedelenmiş hücre yada ölü hücre sınırları kesin olmayan sürekli işlevsel ve yapısal evrelerdir.

Hücre ölümünün iki temel paterni nekroz ve apoptozistir.

Nekroz, hücre ölümünün en yaygın tipidir. İskemi, kimyasal zedelenme veya ekzojen uyarılar ile şiddetli hücre şişmesi, rüptürü, sitoplazmik proteinlerin parçalanması ve organellerin yıkımı oluşur. İskemiye maruz kalan hücrelerdeki membran harabiyetinin mekanizmaları Şekil 2'de özetlenmiştir.

Apoptozis ise kontrollü bir ölüm programı olarak tarif edilebilir. Nekroz ile mekanizmaları farklı olduğu gibi morfolojik özelliğide esasen kromatin yığılımı ve parçalanmasıdır (15-17).



Şekil 2 :İskemi ve reperfüzyonda membran harabiyetinin mekanizmaları (Robbins, Pathologic Basis of Disease)

NEKROZ

Zedelenmiş hücrede enzimlerin etkisiyle hücrenin parçalanması nekroz adını alır. Nekrozdaki değişikliklerin temelinde 2 olay vardır: Hücrelerin enzimatik sindirimi ve protein denatürasyonu. Proteinlerin denatürasyonu (koagülasyon nekrozu) veya enzimatik sindirimin (likefaksiyon nekrozu) baskınlığına göre iki tür nekrozdan birisi gelişir.

Koagülasyon nekrozu, koagüle hücrenin en azından birkaç gün süre ile ana hatlarını korumasıdır. Zedelenme veya ilerleyen asidoz yalnızca yapısal proteinleri denatüre etmez fakat aynı zamanda enzimatik proteinleri de denatüre eder ve böylece hücrenin proteolizisi bloke olur. Koagülasyon nekrozu, beyin dışında hipoksik ölü hücrelerin karakteristik nekrozudur. Myokard infarktüsü buna en iyi örnektir. Burada asidofilik, koagüle, çekirdeksiz hücreler haftalar boyunca kalır.

Likefaksiyon nekrozu, otoliz veya heteroliz sonucu oluşur, fokal bakteriyel enfeksiyonlar için karakteristiktir. Merkez sinir sistemindeki hipoksik hücre ölümü likefaksiyon nekrozuna örnektir.

Enzimatik yağ nekrozu, özel nekroz biçimi değildir. Yağ dokusunun anormal aktive pankreas enzimlerinin pankreas dokusu ve periton boşluğuna serbestleşmesi ile oluşan fokal yağ harabiyet alanlarıdır (15-17).

APOPTOZİS

İlk olarak 1972 yılında Avusturalya'lı patolog John F. Kerr tarafından tanımlanmış olup, daha sonra Wyllie ve diğerleri tarafından morfolojik, biokimyasal ve genetik çalışmaların ilerlemesiyle detaylı olarak tariflenmiştir. Apoptozis terim olarak Yunancada kaybolmak (Falling off) anlamına gelmektedir. Şimdilerde "Programlı hücre ölümü" olarak anılmaktadır. Apoptozis genetik bir olaydır ve rol aldığı tespit edilen durumlar şunlardır :

- 1-Gelişim sürecinde
- 2-Dokuda denge mekanizması olarak
- 3-İmmün reaksiyonlardaki gibi savunma mekanizması olarak
- 4-Hastalık veya başka etkenlerce hücre zedelenmesi olduğunda
- 5-Yaşlanmada

Normal gelişim :

Memeliler ve alt türler gelişim sürecinde ortak özellikler taşır. Ölümün gelişiminde oluşan değişikliklerin araştırıldığı çalışmalarda kullanılan *C.elegans* nematodu ile gelişmiş hayvanlarda apoptozisin genetik kontrolü ortak özellikler taşır. Örneğin ICE (Konverting enzim inhibitörü) ve bcl-2 nin, *C.elegans*'taki homologları ced-3 ve ced-9 genleridir.

Metamorfoz sürecinde, küçük vertebralılardaki larval organların kaybı, örneğin kurbağa yavrusundaki kuyruğun kaybı, morfolojik olarak tipik bir apoptozis sonucu

oluşur. Vertebralılardaki normal gelişim sırasında olan programlı hücre ölümü yinede klasik apoptozisten farklı yönler içerir.

1966' da Saunders, amniota embriyolarında interdigital dokunun yoğun fakat kontrollü bir hücre ölümü ile kaybı sonucu el ve ayak parmaklarının ortaya çıktığını göstermiştir. Gerileyen dokulardaki morfolojik çalışmalarda apoptozisin DNA jel elektroforezinde bulunan intermikrozomal DNA parçalanması ile korelasyonu gösterilmiştir. Vertebralıların sinir sisteminin gelişimi sırasındaki hücre ölüme yoğun olarak araştırılmıştır. Astrositler, oligodentrositler ve nöronlarda da apoptozis oluşmaktadır. Sinaptik bağlantılar oluşuktan sonra nöronların %50 den fazlası ölmektedir. İnsan retinasında gelişim sırasında apoptotik hücre ölümü iç nükleer, ganglion hücreleri ve subventriküler katlarda görülür, ki bunlar infiltre makrofajlardan çok retinal hücreler tarafından fagosite edilir.

İntrauterin yaşam boyunca, memeli intestinal mukoza epitelyal hücreleride apoptozise gider, takiben lümen gelişir ve villuslar oluşur. Çoğu apoptotik cisimcikler çevre epitelyal hücrelerce fagosite edilir, bazılarıda lümene dökülür. Rat böbreğinin normal gelişiminde, metanefrik mezenkimal hücreler de programlı olarak apoptozise gider, eğer yeterli olmazsa üreterik tomurcuklar halinde kalır.

Apoptozis immün sistemin gelişiminde de anahtar rol oynar. Timusun gelişiminde immatür T hücrelerinin üzerindeki, kendi antijenine cevap veren T hücre reseptörlerinin oluşumunu sağlarken, apoptozis ile eliminasyon gerçekleşir. B hücrelerinde de olasılıkla, apoptozis sonucu, otoreaktif B hücrelerinin kaybolması gerçekleşir.

Hücre farklılaşmasının sonlarındaki atipik apoptozis :

Bazı dokularda hücreler nihai farklılaşmaya giderken apoptozisin tüm özelliklerini içermezler. Örneğin normoblast nükleusunda DNA bölünmesi ile birlikte yoğunlaşmada oluşur. Nükleusu bir uca yerleşen hücrede sitoplazmik ince bir rim plazma membranını çevreler. Nükleus ile hücrenin geri kalan kısmı arasında gelişen ayrılma sonrasında nükleus makrofajlarca fagosite edilir ve ardından sağlam eritrosit oluşur. Tavuk lenslerinin gelişimi sırasında da primer lens fibril hücre nükleusu

piknozise gider ve nükleozomal parçalardan DNA'nın ayrışması sonrası doğumdaki lens merkezinde nükleussuz doku görüntüsü oluşur.

p53 retinoblastom proteinlerinin, fibril gelişimlerdeki dengeli işlevleri ile uygun zaman ve lokalizasyonda apoptotik nükleer değişiklikler oluşur.

Apoptozisin özel bir formunda da deride granüler tabakadaki keratinositler, sonuçta skuam haline gelirler. Burada klasik apoptotik nükleus morfolojisinde hücreler görülür. Ancak normal apoptozisteki gibi tomurcuklanma ve hücrel ayrılma yerine, deri yüzeyindeki yassılaştırmış nükleussuz keratinosit tabakası meydana gelir.

Erişkin dokulardaki normal hücre döngüsü :

Hücrelerdeki spontan apoptotik kayıp, yavaş ve hızlı çoğalan memeli hücre populasyonlarının bir özelliğidir. Post mitotik hücrelerin baskın olduğu dokularda örneğin beyin ve kalpte apoptozis normalde gözlenmemiştir. Yavaş çoğalan dokularda örneğin karaciğer, prostat, pankreas, parotis bezinde normal dokuda az sayıda apoptotik cisimcikler bulunur. Karaciğerde terminal hepatik venülün yakınlarında zon 3' te hemen daima apoptotik cisimcikler bulunur. Erişkin rat adrenal glandında, 2/3 iç tarafında, serum ACTH düzeyleri ile kontrol edilen apoptotik hücre kaybı gösterilmiştir. Apoptotik cisimcikler daha çok retiküler alanda görülmüştür. 3-OH nick and labeling yöntemi ile de retiküler tabakada baskın olduğu gösterilmiştir. Kortikosteroid uygulaması ile endojen ACTH'nın baskılanması sonucunda adrenokortikal hücre apoptozisinde büyük artışlar meydana gelmiştir ve bu eksojen ACTH verilmesi ile tekrar düzeltilmiştir.

Hızlı çoğalan dokularda örneğin GİS (gastrointestinal sistem) epitelinde, proliferasyon ve apoptozis güzel bir denge oluşturmuşlardır. İnce barsakta apoptotik hücreler sıklıkla villusların ucuna doğru yerleşir ancak bazılarında intestinal kriptlerdeki proliferatif bölümlere yakın yerleşir. Kolonda ise epitel içinde daha az da lamina propriada, kriptlerin üzerinde yerleşir. Barsak içindeki epitelyal hücre kaybı, yüksek seviyedeki epitelyal hücre proliferasyonu ile dengelidir.

Seminifer tubüllerdeki spermatogonialarda apoptozis gözlenmekte olup, nadiren spontan spermatozoid ve spermatozoid ölümünde klasik nekroz olayı gündeme gelir.

Lenf nodlarında, germinal merkez hücrelerinde yüksek oranda ölüm mevcuttur, sağ kalan hücreler antijen bağlama yeteneğine göre seçilirler. Seçilemeyenler apoptozise uğrar. Germinal merkezdeki makrofajlarda apoptotik cisimcikler sitoplazma içinde hafif bir silüet oluştururlar.

Megakaryositler, sitoplazmalarından plateletleri oluşturduktan sonra kalan kısmı kemik iliğinde apoptozis ile kaybolur. Bazı tür nötrofillerde de apoptozis izlenir.

Erişkin dokularda siklik hücre kaybı :

Birçok hücre popülasyonu büyüme hormonunun etkisi altındadır. Büyüme hormonundaki azalma, hücrelerde delesyona sebep olur. Bu hücrelerin kaybıda apoptozis ile gerçekleşir.

Erişkin memesinde, menstrüel siklusun 25.gününde kanal epitelinde mitozis maksimum seviyededir. Buna paralel olarak 28.günde bu hücrelerde apoptozis maksimum seviyeye ulaşır. Bu alandaki apoptotik hücreler komşu epitelyal, myoepitelyal, intraepitelyal makrofaj hücreleri tarafından fagosite edilir. Bu işlem apoptotik hücreler lümenine dağılmadan gerçekleşir.

Bcl-2 ile boyamada menstrüel siklusun sonunda boyanmada ciddi bir azalma gözlenir, bu sırada apoptoziste bir pik meydana gelmiştir. Geç sekretuar, premenstrüel fazda endometrium epitelinde apoptozise bağlı azalma gözlenir. Aynı değişiklikler hamster endometriumunda da izlenir.

Neonatal periyotta ACTH sirkülasyonunda azalma ile rat adrenal korteksinde kayıp vardır. Doğumdan sonra iç adrenal korteks katında apoptotik cisimcikler görülmektedir.

Laktasyondaki meme de, süttten kesilmeden itibaren hızla involüsyona uğrar. Bu da sirkülasyondaki prolaktin seviyesindeki azalmayla bağlantılıdır. Farelerde başlangıç involüsyonu çok hızlı gelişirken çok sayıda apoptotik epitel hücreleri gland lümenine yayılır.

İntraepitelyal makrofajlar tarafından, myoepitelyal-epitelyal apoptotik cisimciklerin fagositozunda artış vardır. Ratlarda değişiklikler daha kademeli olup, apoptotik hücrelerin lümene yayılması belirgin değildir.

Her iki grup hayvanda da endotelyal hücrelerin apoptozisi, kapiller sistemin gerilemesi sonucudur, olaya glandüler doku kaybıda eşlik eder. İnternükleozomal DNA parçalanması faredeki involüsyonda , apoptozisin karakteristik özelliğidir.

Doğumda var olan ovarian foliküllerin %99'dan fazlası atreziye uğrar. 3-OH end labeling yöntemi kullanılarak apoptozisteki DNA fragmentasyonu gösterilebilir. Tavuk overlerinde atrezik foliküllerde bu karakteristik değişiklikler gösterilebilmiştir. Postovulatuvar foliküllerde DNA parçalanması mevcuttur, fakat preovulatuvar foliküllerdeki DNA intakt kalır. Granülosa hücreleri apoptozise uğrarken, teka hücreleri ovarian stroma tarafından yavaş yavaş absorbe edilir. Koyun ovarian hücrelerinin atrezisinde, teka interna hücreleri apoptozisle yok olur.

Saç kıllarında da dış tabakadaki epitelyal hücrelerde apoptozis görülür. Apoptotik cisimler komşu epitel hücreleri tarafından fagosite edilir. Dış büyümesinde, çevredeki dokuların reabsorbsiyonunda apoptozise örnektir.

Patolojik atrofide de hücrelerdeki değişiklikler apoptozise benzemektedir. Rat prostatında kastrasyonu takiben sirkülasyondaki hormonların azalmasına bağlı olarak atrofi oluşur. Kanal obstrüksiyonuna bağlı ekzokrin bezlerin atrofisinde, hidronefrozdaki renal atrofide, böbrekte orta dereceli iskemide apoptozis oluşur.

Sitotoksik T hücreleri, K hücreleri, Naturel killer hücreler tarafından indüklenen hücre ölümü apoptozisin bir formudur. Bu tür ölümler hücreyel immünite bağımlıdır. Duyarlanmış T hücreleri tarafından hedef organdaki apoptoziste sitoplazmik proteazlar aktive olur. Bu aktivasyonda birçok mekanizma görev alır. Bunlar, Fas reseptörleriyle bağlantılıdır. T hücrelerinin rol aldığı apoptotik hücre ölümü, transplant rejeksiyonunda, graft versus host reaksiyonunda, akut ve kronik hepatitte, primer bilier sirozda, liken planusta görülür.

Viral enfeksiyonlarda da apoptozis oluşur; bu da viral sitotoksite, TNF indüksiyonu, hücre büyümesini sağlayan sinyal uyuşmazlığı ile olur. CD4+ hücrelerinin uygunsuz indüksiyonu HIV tarafından oluşturulan AIDS patogeneğinde önemli rol oynar.

Sonuç olarak apoptozis birçok fiziksel, adaptif ve patolojik olayda yer almaktadır. Bunları özet olarak sıralayabiliriz;

-Embriyogenezde hücrelerin programlı yıkımında (İmplantasyon, organogenezis, gelişimsel yavaşlama ve metamorfoz gibi)

-Yetişkinlerde hormona bağımlı yıkımlarda, örneğin menstrüel siklusta endometrial hücrelerin dökülmesi, menapozda overlerde follüküler atrezide, süttten kesilme sonrası memenin gerilemesinde ve kastrasyon sonrası prostat atrofisinde.

-Proliferasyon kabiliyeti olan hücrelerde, örneğin barsak epitelinde.

-Tümörlerdeki hücre ölümünde.

-Akut inflamatuvar yanıt sırasında nötrofillerin ölümünde.

-İmmün hücrelerin ölümünde.

-Sitotoksik T hücrelerince yönlendirilen hücre ölümünde (GVHD ve hücre sel immün rejeksiyonda).

-Kanal tıkanması sonrasında parankimal organlardaki patolojik atrofide (Pankreas, Parotis, Böbrek gibi).

-Viral hastalıklardaki hücre zedelenmesinde (Viral hepatit-Councilman cisimciği-).

-Değişik zedelenme etkenleri, örneğin ısı, radyasyon, sitotoksik kemoterapötikler, hipokside de gözlenir (16-19).

-Denervasyon sonrası dildeki tat tomurcuklarında sayıca ve hacimce azalmada (20).

-Tip-I otoimmün hepatit olgularında progresyonda (21), yaşa bağılı nöronal kayıpta (22), myokard iskemisi ve kalp yetmezliğinde (23-25).

APOPTOZİS MORFOLOJİSİ

IŞIK MİKROSKOP BULGULARI :

Kültür hücrelerinde apoptotik cisimcikler birkaç dakikada oluşmasına rağmen in vivo apoptozis histolojik olarak 3-4 saatte görülebilir hale gelmektedir. Bu yüzden tomurcuklanan hücreler nadiren görülür ve apoptotik cisimcikler değişik

evrelerde dejenerasyon gösterir. Olasılıklarda tomurcuklanan hücreler, fiksasyon öncesi apoptotik cisimcik formasyonuna geçişi tamamlamaktadır.

Histolojik olarak apoptotik cisimcikler HE preparatlarda tek tek veya küçük kümeler halinde görülür. Apoptotik hücre yuvarlak veya oval, yoğun eozinofilik sitoplazmalı, yoğun nükleer kromatin içeren hücreler halindedir. Bazen bazofilik nükleer materyal içermeksizin görülebilir. Bazen de nükleus içinde karakteristik kresent tarzında kromatin yığılımı gözlenir. Nekrozun aksine inflamasyonla birliktelik göstermezler. Nekrozun erken döneminde de nükleer kromatin yığılımı oluşur ancak apoptozisteki gibi perifere ve düzensiz sınırlı olarak yerleşmezler. Apoptozis fizyolojik ve patolojik olaylarda yer almasına rağmen nekroz daima patolojiktir (Nekroz ve apoptozisin farklılıkları Tablo 2'de gösterilmiştir).

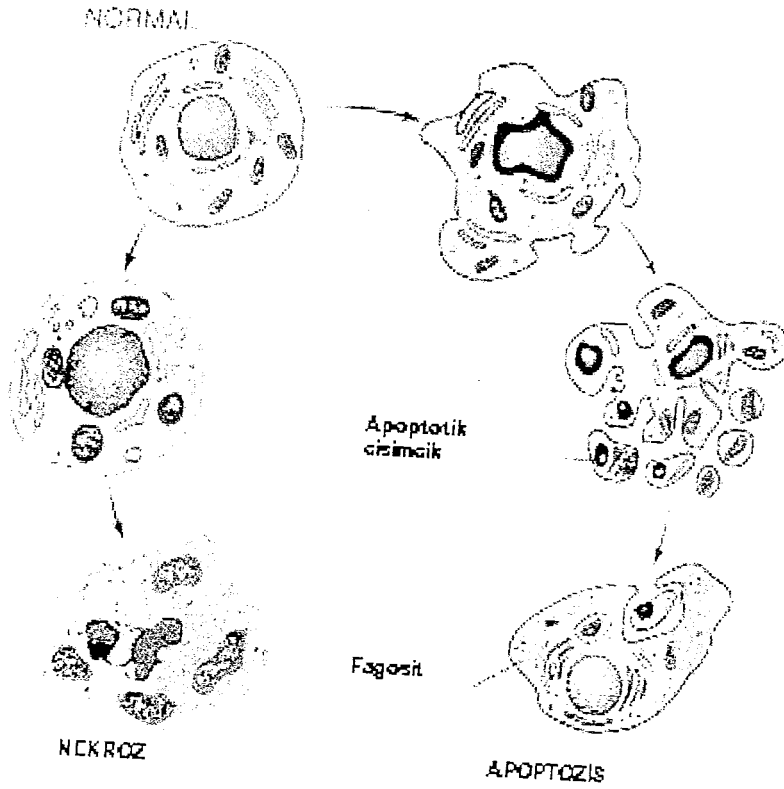
Değişik dokularda apoptotik cisimcikler özel isimlerle anılmaktadır. Örneğin, karaciğerde Councilman cisimcikleri, barsak kriptlerinde karyolitik cisimcikler, lenf nodlarında germinal merkezlerdeki cisimcikler (tingible bodies), UV radyasyon sonrası ve Liken planusta görülen Civatta cisimcikleri gibi.

ELEKTRON MİKROSKOP BULGULARI :

Apoptotik hücreler, sitoplazması yoğun, küçük hacimli hücrelerdir, organeller relatif olarak normal, ancak daha sıkı paketlenmiştir. Hücre yüzeyine paralel sitoplazmik flamanların yığılımı, ribozomal partiküllerin kümelenmesi ile bazı hücrelerde rough endoplazmik retikulumun "whorl" oluşturması izlenebilir.

Kromatin yığılımı, apoptozisin en karakteristik özelliğidir. Kromatin yığınları, periferde nükleer membranın altında değişik şekil ve büyüklüklerde iyi sınırlı, yoğun kitleler halindedir. Nükleus iki veya daha fazla parçalı olabilir. Nadiren yoğun kromatin kitlelerine yakın nükleer porlar görülebilir. Nükleolar değişikliklerde oluşur ancak bazı düz kesitlerde görülür. Nükleusun merkezindeki fibriller kor'dan ayrı olarak periferde, osmiofilik granüllerin agregatları şeklinde nükleolar kromatin izlenir. Nükleer değişikliklere eş olarak, hücre hacmi azalır, yoğunluğu artar, sitoplazmik organeller kompakt hale gelir, hücre ve nükleus kenarları büzüşür. Apoptotik hücre yüzeyinde sitoplazmik tomurcuklanmalar ile membranla çevrili

apoptotik cisimcikler görülür. Komşu sağlıklı hücreler, diğer parankimal hücreler veya makrofajlarca fagosite edilen apoptotik hücreler veya cisimcikler lizozomlarca hızla eritilir. Plazma membranı apoptozis sürecinde geç devrelere kadar sağlamdır. Nekrozda ise plazma membran harabiyeti erken dönemlerde oluşur (16-19).



Şekil 3 : Koagülasyon nekrozu ve apoptoziste ardışık ultrastrüktürel değişiklikler (Robbins, Pathologic Basis of Disease)

BIOKİMYASAL ÖZELLİKLER

PROTEİN AYRIŞMASI:

Yeni keşfedilen sistein proteaz ailesinden olan Caspase enziminin aktivasyonu ile apoptoziste spesifik bir özellik olan protein hidrolizi gerçekleşmektedir. Endonükleazların tetiklenmesiyle aktive olan Caspase enzimi nükleer ve sitoplazmik proteinlerin ayrışmasına yol açar.

PROTEİN ÇARPRAZ BAĞLANMASI:

Transglutaminaz aktivasyonu ile sitoplazmik proteinlerin yoğun kovalent bağlarla çarpaz bağlantıları gerçekleşir.

DNA KIRILMASI:

Apoptotik hücrelerde 50-300 kilobazlık büyük DNA parçacıklarının parçalanması karakteristiktir. Ardından, Ca ve Mg' a bağlı endonükleaz aktivasyonu ile internükleozomal ayrışma meydana gelir. Endonükleaz aktivitesi, hücre ölümünün sitokimyasal tetkiklerle belirlenmesinde temel reaksiyondur. Bununla birlikte internükleozomal DNA ayrışması apoptozis için spesifik değildir.

FAGOSİTİK DÜZENLEME:

Apoptotik hücreler plazma membranlarının dış katlarından Fosfatidilserin salgırlar. Apoptozisin bazı tiplerinde de, apoptotik cisimciklerin yüzeyinden thrombospondin (adhesive glycoprotein) salınmaktadır. Bunlar, ölü hücrelerin makrofajlar veya komşu hücrelerce fagosit edilmesinde, diğer öncü inflamatuvar hücrelere ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır.

TABLO 2 : HÜCRE ÖLÜMÜ TİPLERİNİN FARKLILIKLARI

| APOPTOZİS | NEKROZ |
|--|----------------------------------|
| Morfolojik kriterler; | |
| Tek tek hücre kaybı | Kümeler halinde hücre kaybı |
| Membran bütünlüğünün kaybı yok | Membran bütünlüğü bozulur |
| Hücre büzüşmesi | Hücre şişmesi ve lizis |
| İnflamasyon yok | İnflamasyon var |
| Bazı makrofajlar ve komşu hücrelerce fagositoz | Sadece makrofajlarla fagositoz |
| Lizozomlar sağlam | Lizozomlar harap |
| Kromatin uniform ve kompakt olarak yoğunlaşır | Kromatin düzensiz olarak yığılır |

Biokimyasal kriterler;

| | |
|--|---|
| Fizyolojik uyarılarla gerçekleşebilir | Hemen daima patolojiktir. |
| Enerji gereklidir | Enerji gerekmez |
| Makromoleküler sentez gerekir | Protein veya nükleik asit sentezi gerektirmez |
| De novo gen transkripsiyonu vardır | Yeni gen transkripsiyonu yoktur |
| DNA fragmantasyonunda rastgelelik yoktur | Rastgele DNA fragmantasyonu vardır |

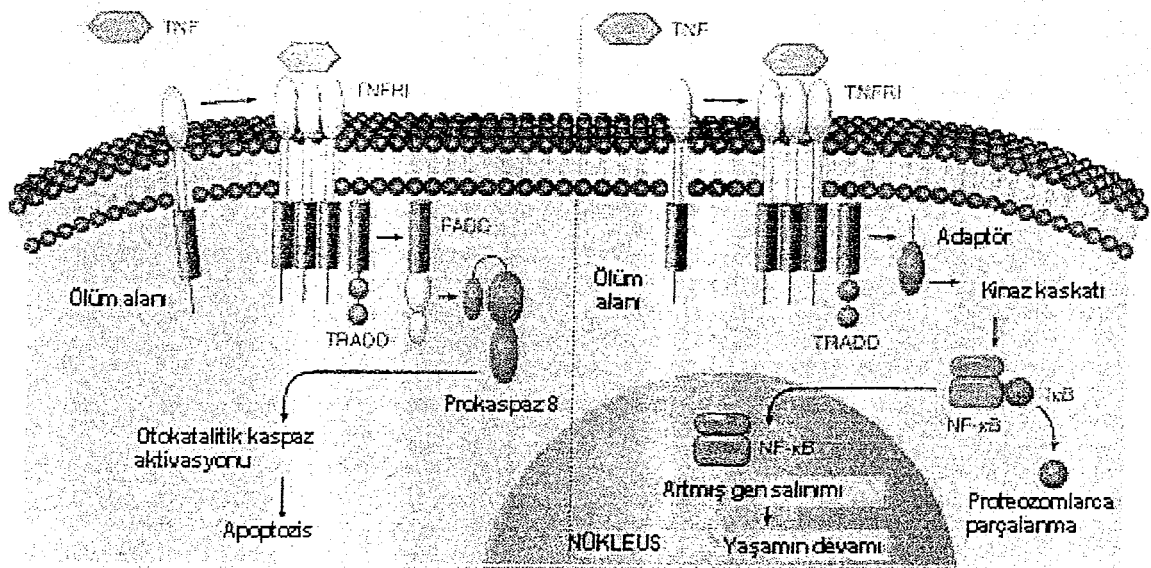
MEKANİZMALAR:

Hücre gelişimi ve apoptozis birbirleriyle ters ancak koordineli olaylardır. *Caenorhabditis elegans* nematodu üzerinde yapılan yoğun araştırmalarda hücre gelişimi ve apoptozis hakkında bilgiler edinilmiştir. Apoptozis bir stimülasyonla başlayan enerji kaskadının son noktasıdır. Bunlar 4 ana başlıkta toplanabilir :

1-Apoptozisi başlatan belirleyici yollar:

Membran üzeri sinyaller:

Apoptozisi pozitif veya negatif etkiler. Örneğin hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ; hücre ölümü programını baskılayıp normal yaşamı stimüle ederken bu faktörlerin yetersizliğinde apoptozis tetiklenir. Bazıları ise direkt olarak reseptörler üzerinden bağlanarak apoptozisi aktive eder. Buna en iyi örnekte Tümör nekrotizan faktör reseptör (TNFR) ailesidir. Embriyonik gelişme boyunca morfojenler, büyüme faktörleri, ayrılaşmayı sağlayan faktörler + veya - işlev görürler (Şekil 4).



Şekil 4 : TNF-R aktivasyonu ile apoptozisin uyarılması veya NF-κB aktivasyonu ile hücre yaşamının devamı (TRADD: TNFR-ölüm alanlarına sahip adaptör protein, NF-κB : Nükleer faktör-κB, IκB : İnhibitör κB) (Robbins, Pathologic Basis of Disease)

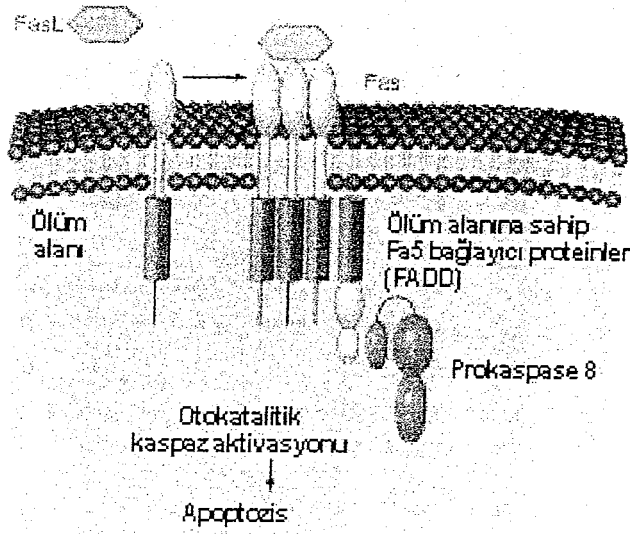
Hücre içi etkenler:

Hücre içi etkenlerde apoptozise yol açar. Bunlar Glukokortikoidlerin bağlandığı nükleer reseptörler, fizikokimyasal ajanlar (radyasyon, ısı, hipoksi, ksenobiotikler, viral infeksiyonlar gibi)

2-Kontrol ve integrasyon:

Hücre içi pozitif ve negatif dengeleyici moleküllerin aktivasyonu ile inhibisyon, stimülasyon veya düzenleme yapılmaktadır. Bu aşamada 2 anayol söz konusudur:

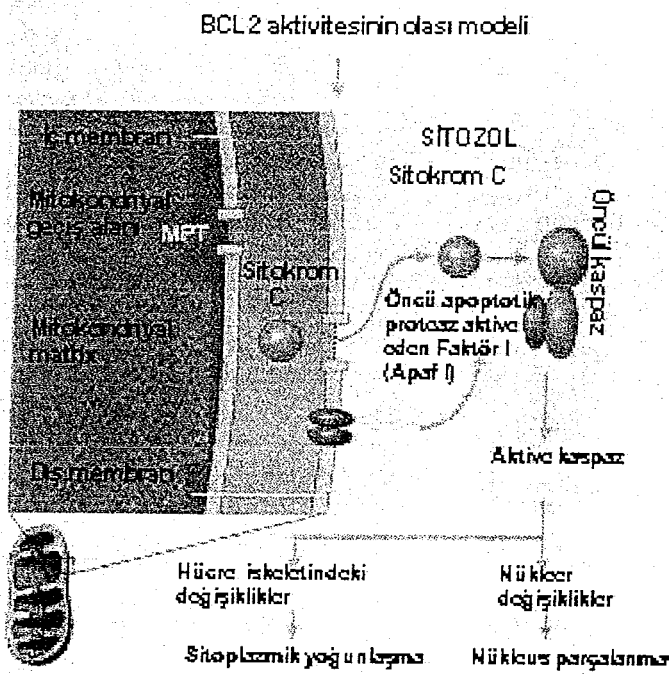
Adaptör proteinler: Direkt etki eder, fas-fas ligand ve sitotoksik T lenfositlerce öldürülen hedef hücreler için tanımlanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5 : Fas-apoptosis etkileşiminde muhtemel model (Robbins, Pathologic Basis of Disease)

Mitokondriyal fonksiyonu etkileyerek:

En önemli örneği apoptozisi baskılayan bcl-2 ailesidir. Ya mitokondriyal permeabiliteyi artırarak, ya da iç mitokondriyal membrandaki sitokrom-C nin salınmasına yol açarak apoptoziste yer alırlar (Şekil 6).



Şekil 6 : Apoptoziste bcl-2' nin etkileri ve mitokondriyal mekanizma (Robbins, Pathologic Basis of Disease)

3-Yürütme fazı:

Bu faz apoptozisin son aşamasıdır ve proteaz ailesinden Kaspaz aktivasyonu işlevseldir. Kaspaz ailesi *C.elegans*'ın ced-3 geninin memelilerdeki homologlarıdır. Kaspaz (Caspase) terimi 2 katalitik enzim sisteminden türetilmiştir. "C" cystein protease mekanizmasını, "aspase" aspartik asit kalıntılarını temsil eder. Şimdilik 10 üyesi tespit edilebilmiştir. Kaspaz 9, pro-apoptotic protease activating factor (Apaf-1)' e bağlanarak, Kaspaz 8 ise Fas-Fas ligand mekanizmasını tetikleyerek apoptozisi düzenler. Kaspaz-3 ise DNA replikasyonunu,

transkripsiyonunu ve tamirini engelleyerek, internükleozomal DNA ayrışmasını aktive ederler.

4-Ölü hücrelerin fagositozu

APOPTOZİSİN SPESİFİK ÖRNEKLERİ

TNFR AİLESİ:

Bir kısmı apoptozisi başlatırken, bir kısmı hücre proliferasyonunu uyarır, bazıları her iki işleve de sahiptir. Sitoplazmik adaptör proteinler içeren reseptörlere bağlanırlar. Hücre ölümünde görev alan 2 önemli üyesi vardır: Fas ve TNFR-1.

SİTOTOKSİK-T-LENFOSİTLERİN UYARDIĞI APOPTOZİS:

Yabancı hücrelerin yüzeyindeki yabancı antijenleri tanıyarak hedef alırlar. Hedef hücrelerin yüzeyindeki fas reseptörlerine bağlanarak etki ettikleri gibi katalitik etkileri olan perforin ve serin proteaz granzyme B enzimlerininide aktive ederek apoptozise yol açarlar.

BÜYÜME FAKTÖR EKSİKLİĞİ SONRASI APOPTOZİS:

Sitokinler veya büyüme faktörleri çoğu hücrenin yaşamını desteklerler. Bunların yokluğunda hücreler apoptozise giderler. Örneğin nöronların gelişiminde önemli olan Nerve Growth Factor (NGF) gibi.

DNA HARABİYETİNE BAĞLI APOPTOZİS:

Radyasyon veya kemotöropetik ajanlara maruz kalan hücrelerde oluşan DNA harabiyeti tamir edilemezse bir tümör süpresör gen olan p53 apoptozisi uyarır.

p53 mutasyone ise veya ortamda yoksa genetik bozukluğu olan hücreler yaşama devam edecek ve problemlere yol açacaktır (16-18).

RENAL HÜCRE ZEDELLENMESİNDE APOPTOZİS VE MOLEKÜLER PATOLOJİ

Renal zedelenmelerde, hücre proliferasyonunun ve apoptozisinin denge mekanizmaları moleküler seviyede de araştırılmaktadır. Bunlardan bazıları OÜ'nin deneysel modellerinde anlaşılmıştır.

Obstrüksüyon sonrası böbrek interstisyumunda kollejenizasyon ve fibrozisin hızlanmasında özellikle mezenkimden salınan AT-2 reseptörünün aktivasyonu rol almaktadır. Bu aktivasyonun, apoptozise giden hücreleri arttırdığına inanılmaktadır (26,27). Çocuk ve infantlardaki en sık renal yetmezlik nedeni olan obstrüktif nefropati, erişkinde en sık renal yetmezlik nedeni olan polikistik böbrek hastalığında, RAS aktive olur, bu da tubuler atrofi ve interstisyel fibroze yol açar ve hastalığın progresyonunu temsil eder. Obstrüktif nefropatide fokal kistik dilate tubuluslar da gözlenir (28).

UÜO sonucu gelişen renal hücre zedelenmesinde tubulointerstisyel hücrelerde belirgin hücre proliferasyonu ve apoptozis gelişmektedir. Obstrükte böbreklerde RAS'ın aktive olmasıyla şiddetli vazokonstrüksüyon ve progresif interstisyel fibrozis meydana gelmektedir. Maturasyonun gecikmesiyle EGF ekspresyonu baskılanır, büyüme faktörlerinin etkilenmesi ile apoptozis uyarılır. UÜO'daki bu gözlemler kistik böbrek hastalıklarındakiler ile benzerdir. Bunlar, EGF' deki azalma, apoptoziste artış ve bcl-2'nin baskılanmasıdır (29).

Bir çalışmada neonatal ratlarda unilateral üreteral obstrüksüyonun, erişkinlerdekinin aksine renin mRNA ekspresyonunu arttırdığı, bunda erişkinlerdeki clusterin ekspresyonunun daha fazla salgılanmasıyla gerçekleştirildiği öne sürülmektedir. Clusterin(sülfated glycoprotein-2) obstrükte böbrekte apoptozisle birlikte ve eksprese edilmektedir. Clusterin ekspresyonu apoptozisi anlamlı derecede azaltmaktadır (27,30). Chevalier, neonatal UÜO sonrası, EGF salınımının gecikmesiyle beraber, peritubuler alfa-düz kas aktin (α -SMA) ekspresyonunun uzadığını ve böbrek matürasyonun geciktiğini söylemektedir. Bu durumda renal apoptozis artmaktadır.

Renal gelişimin düzenlenmesi yönünde de Clusterin salınımı artmaktadır. Bu olaylar tubuler hücre matürasyonunu veya dedifferansiyasyonunu durdurur (31).

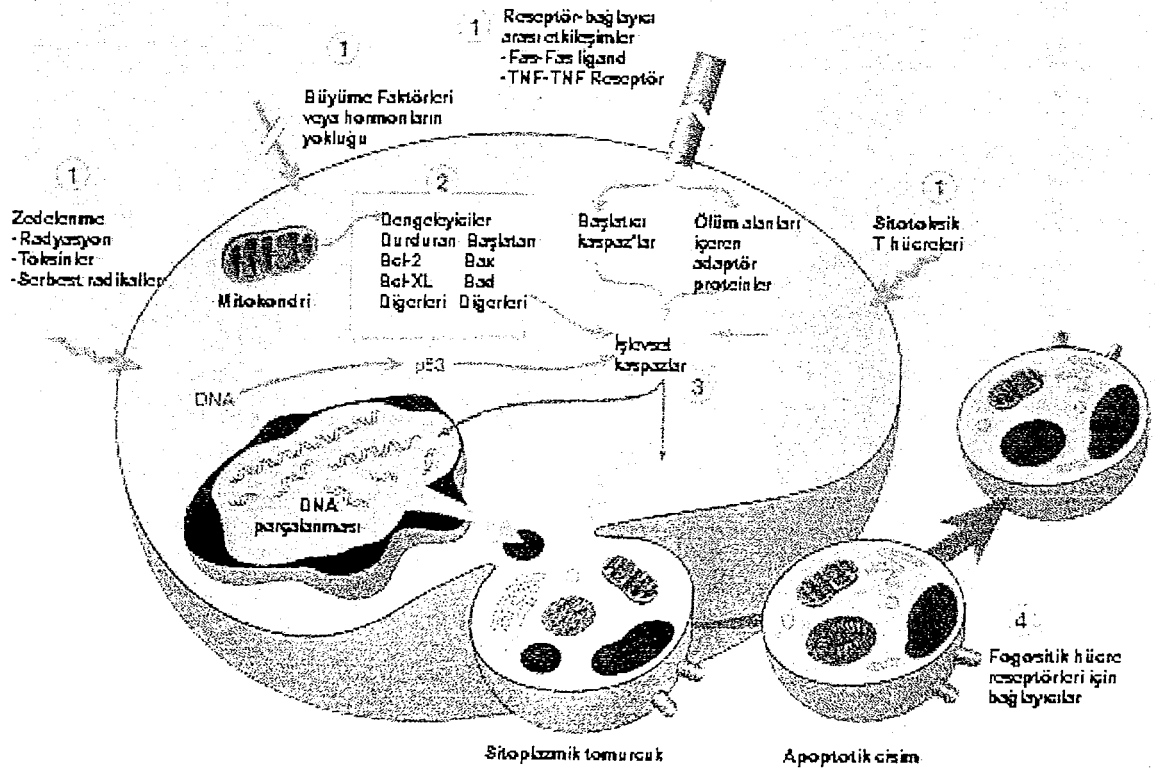
Ayrıca büyüme faktörlerinin azlığı ile beraber, reaktif oksijen türleri, antitiroid-1-monoklonal antikolar ve anti-fas antikolar apoptozisi uyarmaktadır (27). Fas yüzey reseptörlerinin yokluğunda, distal tubuler hücrelerde apoptozisin kısmen devam ettiği, interstisyel hücre ölümünde de anlamlı bir rolü olmadığı gösterilmiştir (32). Obstrükte böbreklerde p27 yokluğunda tubulointerstisyel hücrelerde hücre proliferasyonu ve apoptozisin şiddetlendiğini gösteren Hughes ve ark., p21'in bu mekanizmalar üzerinde çok etkin olmadığını, ancak myofibroblast proliferasyonunu artırdığını öne sürmektedirler (33). Rat böbreklerinde yapılan bir deneysel çalışmada, akut UÜO sonrası, EGF mRNA salınımı ve distal tubuluslardaki EGF protein düzeylerinin azalması ile karakterize hidronefroz bildirilmektedir. Apoptozis te karakteristik olarak artmaktadır. Bu hayvanlara ekzojen EGF verilmesi ile apoptozisin baskılandığı (%50 azalmaktadır), renal tubuler epitel hücre rejenerasyonu ve kortikal mitotik aktivitede artış olduğu dikkati çekmiştir (34). Neonatal ratlarda oluşan obstrüktif nefropatide renal hücre proliferasyonunun azaldığı, apoptozisin arttığı gözlemlenmiştir. Neonatal rat böbreğinde TOÜ sonucu kronik atrofi ve diffüz interstisyel fibrozis gelişir. Ekzojen EGF tedavisiyle obstrükte böbrekte renal tubuler hücre epitel proliferasyonunun %76 arttığı apoptozisin %86 azaldığı gösterilmiştir. Böylece tubuler dilatasyon, tubuler atrofi ve interstisyel fibrozis gerilemektedir. Sonuçta EGF'nin, renal tubulus epitel hücreleri için mitojenik substans ve kritik bir sağkalım faktörü olduğu öne sürülmektedir (34,35). İnflamatuar sitokinlerde nekrotik ve apoptotik hücrelerin oluşumunu uyarmaktadır. Nitroz oksit'te bu süreçte sitotoksik rol oynamaktadır (36). Renal tubuler apoptozis ile birlikte EGF ve TGF- β ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Renal sitemlerin gelişimi üzerindeki çalışmalarda EGF'nin normal böbrek gelişimindeki apoptozisi inhibe ettiği öngörülmektedir. Komplet uretral obstrüksüyonu takiben ratlara EGF verilmiş sonuçta hidronefrotik böbrekteki toplayıcı kanallar ve distal tubullerdeki epitelyal hücrelerde apoptozisin baskılandığı, tubuler epitel hücre yenilenmesinde uyarıldığı gözlenmiştir (37). Chevalier, bir değerlendirme makalesinde konjenital unilateral üretral obstrüksüyonda karşılaşılan değişiklikleri şöyle özetlemektedir: UÜO 'u takiben böbrekte büyüme durur, karşı böbrekte kompensatuar büyüme gelişir. Renal damarlanma gelişimi bozulur.

Renin-anjiotensin sisteminin aktivasyonu ile obstrüksüyon ilerler, glomerüler matürasyon gecikir, nefrogenez bozulur. Tubuluslarda proliferasyonu baskılar, apoptozisi uyarır, immatür tubul epitel hücreleri oluşur. Tubuler EGF salınımı baskılanır, TGF- β 1 ve clusterin salınımı artar. İnterstisyel fibroblastların maturasyonu gecikir, tubuler atrofi ve interstisyel fibrozis ilerler ve RAS'ın ve oksijen radikallerinin aktivasyonu ile ağırlaşır (27).

Deneysel hidronefroza reaktif oksijen türlerinin ve makrofajların rolü de araştırılmıştır. Tam üreteral obstrüksüyonda, tubuler zedelenme ve disfonksiyona yol açan aşırı inflamatuvar ve fibrojenik yanıt değerlendirilmiştir. Verilerden elde edilen sonuç, OÜ'de makrofaj-derive proinflamatuvar mediatörler'in (özellikle fibrojenik sitokinler ve reaktif oksijen türleri) üreteral obstrüksüyonun pro-inflamatuvar dönemi ve interstisyel fibrozisin geç gelişimi arasında esas bağlantıyı sağladıklarıdır (38). Akut testiküler iskemi sonrası da reaktif oksijen türlerinin torsiyon sonrası germ hücresine özgü apoptozisi indüklediği (39), kokaine bağlı toksik metabolitlerin de spermatogonia ve spermatozoidlerde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (40). Yu ve ark.nın yaptığı bir çalışmada ise p53 ve apoptozisteki artışın, iskemi zamanı ve sıcaklıkla yakından ilişkisi olduğu ve 1.haftada pik yaptıkları tespit edildi. 1 haftalık böbreklerdeki Malonildialdehid peroksidasyon ürünleri ve lökotrien seviyelerinde artış gözlemlendi. Mediatör düzeyindeki değişiklikler ile iskemi süresi ve sıcaklık arasında yakın ilişki izlendi (41). Kültüre renal hücrelerde, siklosporin A'nın nitrik oksit sentetaz aktivasyonu ve p53'ün indüklenmesi yoluyla apoptozisi uyardığı öne sürülmektedir. Bu etkinin, siklosporin A nefrotoksitesinin geç dönemindeki karakteristik asellüler fibrozise yol açabileceği düşünülmektedir (42).

Anjiotensin-II, reaktif oksijen türleri, Jun-N terminal kinaz ve p53 apoptozisi indüklemektedir. PDGF, interstisyel fibroblast proliferasyonunu başlatır. Clusterin, EGF, IGF-I, bcl-2, Osteopontin apoptozisi inhibe etmektedir (43). TGF- β ve p21 hücre siklusunu inhibe eder. TGF- β 1'in, RAS'ın düzene sokulmasında rolü olduğu gösterilmiştir (10). IGF-I, apoptozisi inhibe ettiği gibi, vimentin ekspresyonunu, kollajen birikimini ve tubuler atrofiyi de azaltmaktadır. Ancak tubuler proliferasyona etkisi gözlenmemiştir (10,44). Osteopontin, tubulointerstisyel hastalıkta renal tubuluslardan salınan makrofaj affinitesi yüksek bir proteindir. Erken interstisyel

makrofaj infiltrasyonu ve interstisyel fibroziste rol alır. Muhtemeldir ki renal tubulointerstisyel hücreler için sağkalım faktörü gibi hareket etmektedir (45). Bir deneysel çalışmada, obstrükte böbreklerde apoptozis olmayan tubuluslarda bcl-2 boyanması fazla, dilate apoptotik tubuluslarda az olarak tespit edilmiştir. Sonuçta, bcl-2'nin, TUÜO'da apoptozis aktivasyonunu ve progresif renal harabiyeti önleyen bir gen olduğu söylenmektedir (46). İnsan tükrük bezi tümörlerinde ve oral epidermoid karsinomlarda dopaminin apoptozise etkisi araştırılmıştır. Dopaminin, p38 mitojen activated protein kinase (MAP kinase) enziminin fosforilasyonu yoluyla, apoptozisi indükleyebileceği ancak bu enzimin inhibisyonunun dopaminin uyardığı apoptozisi inhibe etmediği öne sürülmüştür (47). İnsan oral tümör hücrelerinde flavanoidlerin de, kaspaz enzimini aktive ederek apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (48). Kolorektal karsinomlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise, Tegafur-urasil bileşiklerinin timidilat sentez inhibisyonu yoluyla apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (49).



Şekil 7 : Apoptozisin moleküler seviyede şematik özeti (Robbins, Pathologic Basis of Disease)

APOPTOZİSİ BELİRLEME METODLARI VE TUNEL

En sık kullanılanı **DNA agaroz jel elektroforezi** tekniğidir. Bu teknikte internükleozomal DNA ayrışması temeline dayanarak düşük moleküler ağırlıklı DNA parçaları tespit edilir ve apoptotik hücre gösterilir. Rutinde kullanılmayan ve daha kompleks bir teknik olan Pulse-field jel elektroforez tekniğinde ise yüksek moleküler ağırlıklı DNA parçaları tespit edilir.

Apoptozis, **flow sitometri** ile de gösterilebilir. Apoptotik hücrelerdeki DNA içeriği sub G1(Ao) fazında en yüksek seviyelerine çıkmaktadır. Nekrozdan ayırmak her zaman mümkün değildir, ancak multipl parametrelerin analizi yardımcıdır.

Son zamanlarda formalin fikse parafin bloklardaki dokularda apoptozisi belirlemede 2 teknik geliştirildi. Birisi **terminal deoxytransferase-mediated bio-dUTP nick and labeling (TUNEL)**, diğeri ise **in situ end labeling (ISEL)** adını almaktadır. Heriki teknikte , enzimatik reaksiyonlara dayanarak apoptotik hücredeki parçalanmış kromatini belirlemektedir. Böylece, belirlenen DNA immünohistokimyasal olarak gösterilmektedir (18).

TUNEL METODU

Kültüre hücre preparatlarında apoptotik hücrelerin hızlı elde edilmesi ve sayılmasını sağlamak için geliştirilmiş bir methodur. Apoptotik hücrelerin ışık mikroskopunda yoğun kromatin içeren diğer elemanlardan, örneğin telefazdaki mitotik hücrelerden veya nötrofil polimorflardan ayırımı bazen güç olmaktadır. Apoptotik hücreyi morfolojisi değişmeden, özelliklede fiksasyonun cinsinden dahi etkilenebilen nükleer morfolojiyi kaybetmeden göstermek gereklidir (50-57).

Apoptozis hızlı bir fenomendir, 2-5 dakikada kromatin yığılması ve hücre parçalanması, 3 saattede fagositoz ve sindirim gerçekleşir. Apoptozise bağlı doku küçülmesinde apoptotik hücrelerin ancak %5' i histolojik olarak görülmektedir. Bu yüzden araştırmacılar sensitivitesi ve spesifitesi yüksek hücre içi duyarlılık (in situ labeling) yöntemlerini geliştirdiler. Apoptotik hücreler, ekzojen enzimler kullanılarak örneğin DNA polimeraz I ve Terminal deoksiribonükleotid transferaz ile kırılan

DNA'nın 3-OH ucundaki nükleotidlerin duyarlılığına dayanarak gösterilmeye başlandı. Bu yöntemlere ilkin Gavrieli ve arkadaşları, daha sonra Gold ve arkadaşları öncülük etmişlerdir. Bu tekniklerin in situ end-labeling (ISEL) ve daha spesifik olanı DNA polimeraz-I in kullanıldığı in situ nick translation (ISNT) ve terminal transferazın kullanıldığı TUNEL yöntemleridir. TUNEL, ISNT'den daha duyarlı ve spesifiktir (50-51,54-56).

TUNEL metodunda kullanılan doku örneklerinde bir kısım araştırmacı, enzimatik reaksiyonun doku fiksatiflerinden etkilendiğini iddia etmekte ve paraformaldehid veya formaldehid önermekte, bir kısmı ise önemli bir fark olmadığını söylemektedir. Bununla birlikte proteinaz K inkübasyonunun ve mikrodalga fırınlama işleminin TUNEL metodunun duyarlılığını arttırdığı söylenmektedir (50). Ayrı bir çalışmada ise DNA'yı eriten enzim olarak Mung bean nülease ile Sı nülease kullanılmakta ve Mung bean nülease ile inkübe edilen dokularda (insan barsak, timus, tonsil...) TUNEL metodunun duyarlılığının arttığı öne sürülmektedir (54). Parafin kesitlerdeki apoptotik hücrelerin TUNEL metodu ile gösterildiği bir çalışmada, apoptotik hücrelerle nekrotik hücrelerin ayrılabilirdiği, nekrotik hücrelerin DNA parçacıklarının rastgele dizilimi ve çok daha soluk boyandığı gösterilmektedir (55). Bir çalışmada da TUNEL metodunun duyarlılığı araştırılmıştır. Malign ve benign olmak üzere 265 adet insan dokusunun parafin kesitlerinde yapılan bir çalışmada, apoptotik hücreleri göstermede TUNEL metodunun iyi bir yöntem olduğu sonucuna varılmaktadır (56) .

MATERYAL-METOD

Çalışmamızda, Yeni Zelanda tipi beyaz tavşanlar kullanıldı. Ortalama ağırlıkları 1500-2000 gram olan erişkin tip tavşanlardı. Kafes boyutları 1X1X1.5 metre olup, %18 protein, %3 yağ, %20 lifli gıdalar, %10 karbonhidrat içeren beslenmeye tabi tutuldular. Ayrıca beslenme süresince 0.009 mg/kg vitamin kompleksi (A-B-C-E) besinlerine karıştırıldı.

Toplam 29 hayvan çalışmaya dahil edildi: 12 tavşanda unilateral tam obstrüksüyon, 12 tavşanda unilateral kısmi obstrüksüyon gerçekleştirilmesi planlandı. Sham grubu olarak 5 adet tavşan kullanıldı. Bütün hayvanlara standart diet ve musluk suyu verildi. 0.04mg/kg sodyum pentobarbital anestezisi intraperitoneal olarak uygulandı. Steril koşullarda uygun temizlik ve örtünmeyi takiben cilt, orta hat abdominal bölgeden traş edildi. Yaklaşık olarak 15cm'lik orta hat longitudinal abdominal insizyon ile katlar geçildi. Kanama kontrolleri 4/0 katgüt ile yapıldı. Cerrahi ekip 3 kişiden oluşup, cerrahi asistanı primer operasyonu gerçekleştirmiştir.

Tam obstrüksüyon, sol üreter, ureteropelvik bölgede 4-5 cm distalinden 5/0 ipek ile bağlanarak gerçekleştirildi. Kısmi obstrüksüyon, psoas kası içerisine 15 mm tünel oluşturulup, üreter, tünel içinden geçecek şekilde 6/0 katgüt ile kenarlar birbirine yaklaştırılmak suretiyle oluşturuldu. Kanama kontrolünden sonra katlar anatomik planda kapatıldı. Bir ay sonra yüksek doz anestezik ajan ile sakrifiye edildiler. Tekrar steril koşullar sağlanarak sol ve sağ böbrekler tekniğe uygun olarak eksize edildi. Böbrekler %10 formaldehid içerisinde fikse edildi. Sham grubundaki hayvanlara aynı doz anestezik ajanın intraperitoneal uygulanmasını takiben, longitudinal abdominal insizyon 4/0 ipek ile kapatıldı. İki gruptaki 12 adet tavşandan alınan sol ve sağ böbrekler ile kontrol grubundaki 5' adet hayvandan alınan sol böbrekler %10 formaldehid solüsyonunda fikse edildi.

Böbreklerden korteks ve medullayı içerecek tarzda kesitler alındıktan sonra doku takibine geçildi. Takip sonrası parafin bloklara gömülen dokulardan 5µ kalınlığında kesitler alındı.

Kesitler deparafinize edildikten sonra birer kesit HE ile boyandı. Sol böbreklerden alınan birer kesite de apoptotik hücreleri göstermek için (Oncor'un Apoptag Peroksidaz kiti -katolog no: S7100- USA) kullanılarak TUNEL metodu ile işlem yapıldı.

Apoptag Peroksidaz kiti şu malzemelerden oluşmaktadır:

- Equilibration buffer
- Reaction buffer
- Tdt enzimi
- Stop/Wash buffer
- Anti-digoksinin peroksidaz
- Plastik kaplayıcılar

BOYAMA İŞLEMİ:

Deparafinize dokular;

1-a) 3 ayrı şalede, 5'er dakika ksilolde

b) 2 ayrı şalede 5'er dakika mutlak alkolde

c) 3'er dakika süreyle ilkinde %95 etanol ile, takiben %70 etanol ile

d) PBS (Phosphate buffer saline) ile 5 dakika süreyle yıkandı.

2-a) Proteinaz K (20µg/ml) şale içinde 15 dakika süre ile uygulandı.

b) İki değişik şale içindeki distile suda yıkandı.

3-a) PBS içinde %3'lük hidrojen peroksid ile 5 dakika oda sıcaklığında endojen peroksidaz işlemi uygulandı.

b)Şale içinde PBS'te 5 dakika süreyle yıkandı.

4-a)Preperatlar üzerindeki aşırı sıvı alındı.

b)Spesmenler üzerine 75 µl Equilibration buffer (15µl/cm²) olacak şekilde, direkt olarak uygulandı.

c) Oda ısısında 10 saniye süre ile inkübe edildi.

5-a)Preperatlar kurulandı.

b) Pipete çekilen Tdt enzimi spesmen üzerine $55\mu\text{l}/5\text{cm}^2$ olacak şekilde uygulandı ve plastik kaplayıcılarla spesmen üzerine hapsedildi.

c) 37 derecede 1 saat süre ile inkübe edildi.

6- Preperatlar, Working strenght stop/wash buffer içeren şalelerde 15 saniye süre ile çalkalandı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

7-a) PBS içeren 3 değişik şalede 1'er dakika yıkandı.

b) Aşırı sıvı alındı.

c) Oda ısısında, spesmen üzerine $65\mu\text{l}/5\text{cm}^2$ olacak şekilde mikropipetle Anti-digoksinin peroksidaz konjugasyon işlemi yapıldı.

d) Humidified chamber içinde oda ısısında 30 dakika bırakıldı.

8- PBS içeren 4 değişik şalede yıkandı.

9-a) Aşırı sıvı alındı.

b) Peroksidaz substrat ile tamamen ve herbir spesmene $75\mu\text{l}/5\text{cm}^2$ olacak şekilde oda ısısında 3-6 dakika tutuldu.

10-a) Distile su içeren 3 değişik şalede 1'er dakika yıkandı.

b) Şale içinde distile suda 5 dakika süre ile inkübe edildi.

11-a) Zemin boyası olarak Light green, şale içinde 10 dakika uygulandı.

b)3 değişik şaledeki distile suda çalkalayarak fazla boyadan arındırıldı.

12-a) Preperatlar 2 dakika süre ile N-butanol içinde dehidrate edildi.

b) Kanada balsamı ile kapatıldı.

İşlem sonunda böbrek tubulus epitel hücrelerinin nükleusuna lokalize, apoptozisin göstergesi olan açık-koyu kahverengi boyanma saptandı.

Apoptotik hücrelerin en yoğun olduğu alanlar gözönüne alınarak, ışık mikroskopunda büyük büyütmede (x40) 1000 hücreden kaçının apoptozise uğradığı tek tek sayıldı. Tam ve kısmi obstrüksüyon grubundaki 12'şer adet olgudaki apoptotik hücre sayıları kaydedildi. Sonuçlar Mann-Whitney U testi ile istatistiksel olarak analize edildi.

BULGULAR

Işık mikroskop bulguları

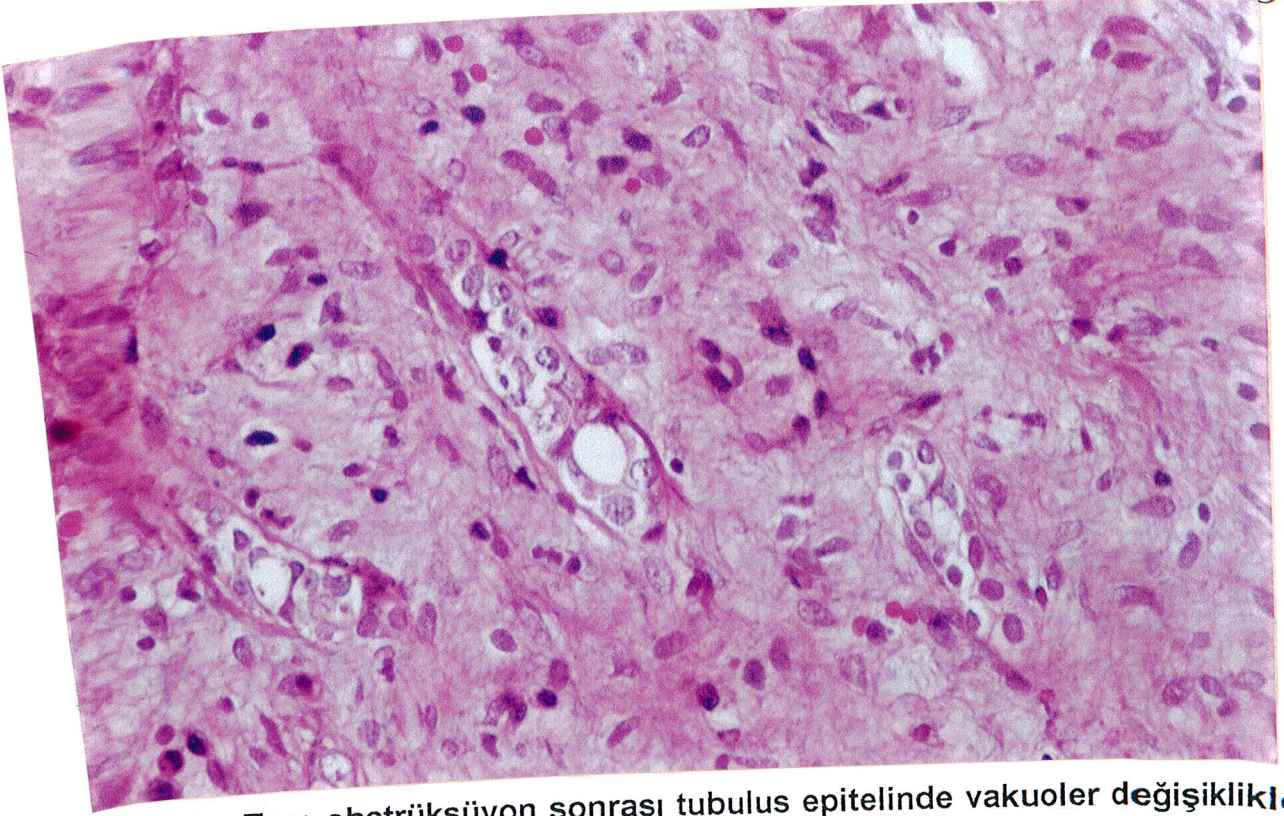
Tam obstrüksüyon grubundaki tavşan böbreklerinin HE preparatları:

Parafin bloklardan yapılan HE kesitlerinde obstrüksüyon sonrası gelişen iskemik değişiklikler gözden geçirildi. Bazı olgularda makroskopik olarak izlenen hidronefrotik değişiklikler mikroskopik seviyede de izlendi. Dokuların çoğunda, interstisyel fibrozis ve mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu vardı. Bir olguda kalsifikasyon ve yağlanma görüldü. Tubulusların bir kısmında kistik atrofi, bir kısmında dilatasyon ve distorsiyon gözlemlendi. Bazı tubulus epitel hücrelerinde nükleuslarda dejeneratif değişiklikler izlendi. Olguların bir kısmında damar duvarlarında kalınlaşma, bazı damar lümenlerinde eritrosit birikimi izlendi. Bir kısmında ise özellikle damarlar çevresinde yoğunlaşan ve yer yer endoteli bozan inflamatuvar infiltrasyon dikkati çekti (Resim 1,2,3).

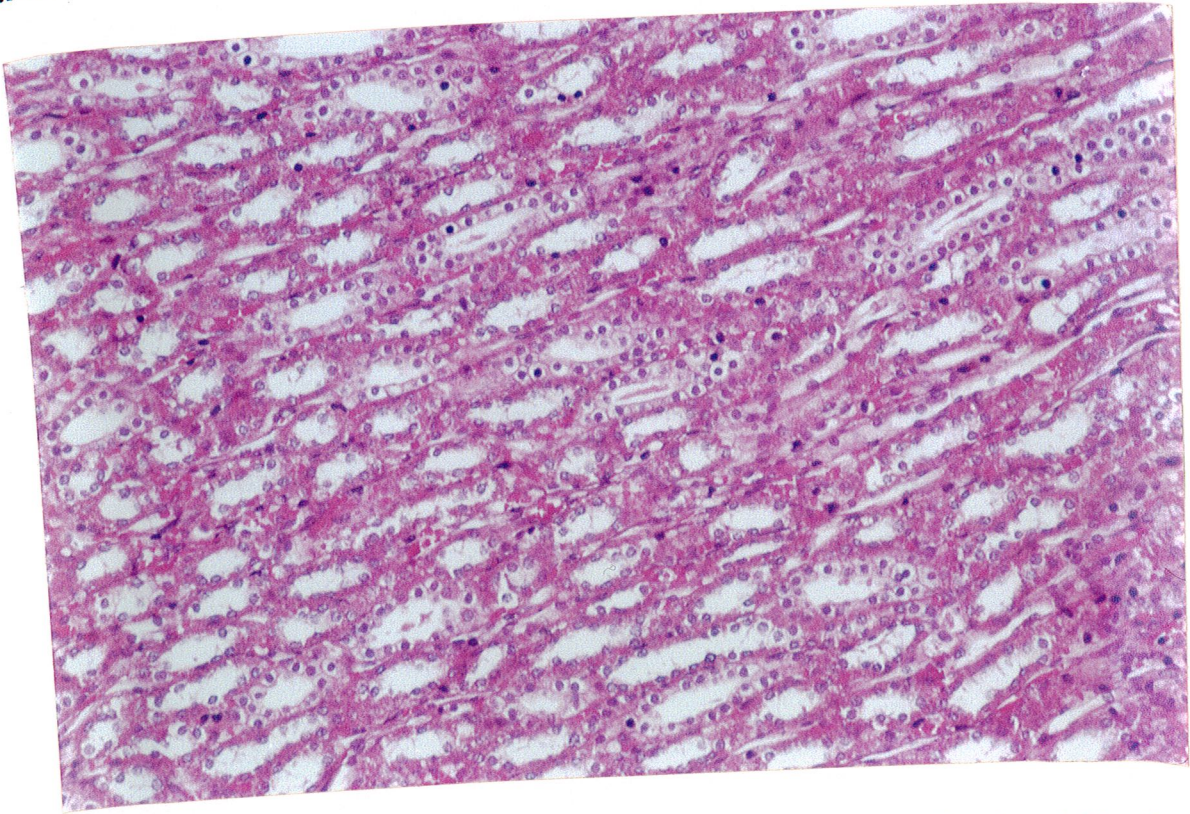
Kısmi obstrüksüyon grubundaki tavşan böbreklerinin HE preparatları:

Olguların bir kısmında, interstisyumda fibrozis ve mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu izlendi. İltihabi hücre infiltrasyonu bazı olgularda damar çevrelerinde yoğunlaşmıştı. Damarların bir kısmında lümeninde eritrosit birikimi izlendi. Bir olguda parankimde kanama ve nekrotik alanlar görüldü. Tubulusların bir kısmı distorsiyone idi ve epitelindeki hücrelerde hafif nükleer dejenerasyon ve vakuolüzyon gözlemlendi (Resim 4,5).

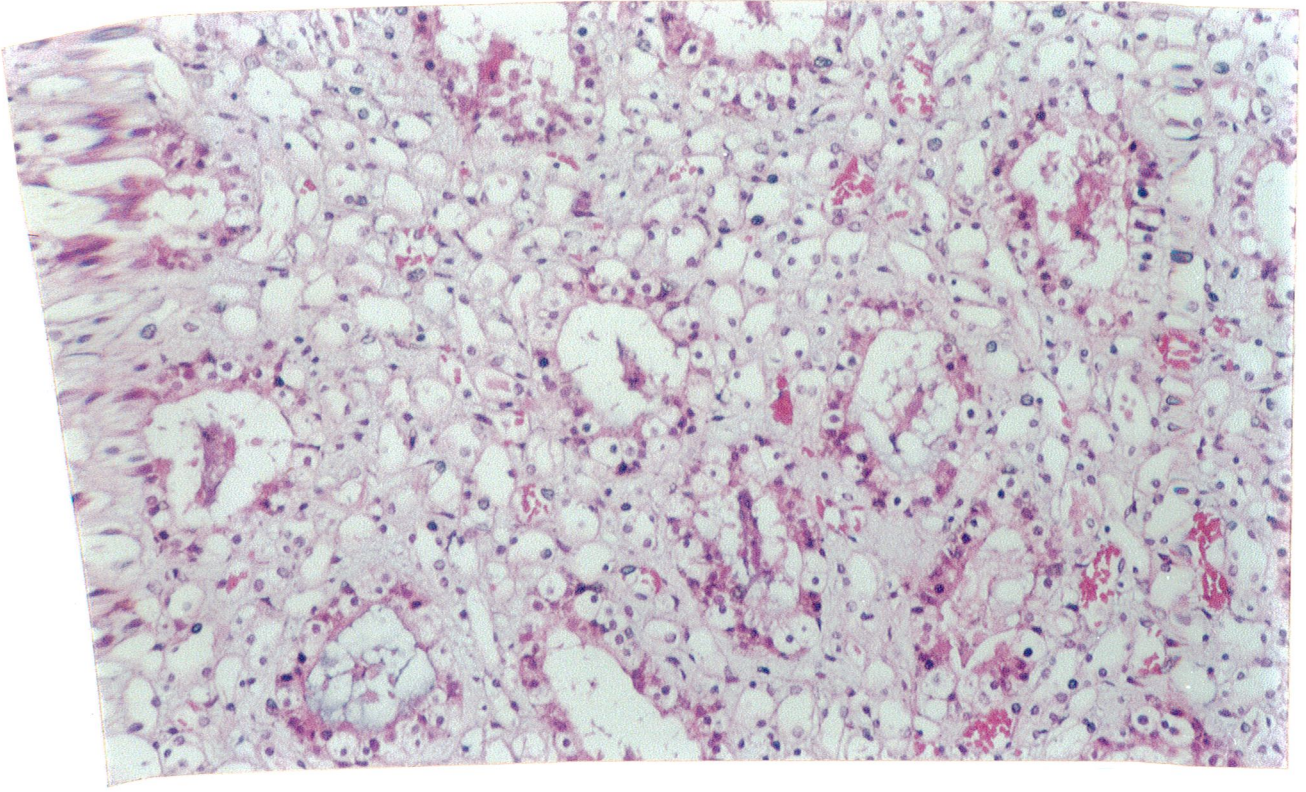
Tam obstrüksüyon ve kısmi obstrüksüyonun patolojik bulgularına bakıldığında, genelde tam obstrükte böbreklerde fibrozisin, tubuluslardaki etkilenmenin daha şiddetli olduğu görüldü. Bazı tam obstrükte böbreklerde makroskopik olarak ta hidronefrotik değişiklikler tespit edildi. Kontrol böbrek kesitlerinde ise, belirgin bir patolojik bulgu görülmedi.



Resim 3 : Tam obstrüksüyon sonrası tubulus epitelinde vakuoler değişiklikler, atrofi ve interstisyel fibrozis (HE, X 100)



Resim 4 : Kısmi obstrüksüyon sonrası tubulus epitelinde vakuoler değişiklikler (HE, X 40)



Resim 5 : Kısmi obstrüksüyon sonrası tubulus epitelinde vakuoler değişiklikler, hiperemi (HE, X 100)

TUNEL metodu bulguları

Böbrek dokusunda gözlenen apoptotik hücreler, daha çok korteksin derin kısmı ve medulla tabakasında proksimal ve distal tubuluslar ile toplayıcı kanallarda döşeyici epitelyal hücrelerde izlendi. İnterstisyumda, damar duvarlarında apoptotik hücreler pek görülmedi. Apoptotik hücreler, yeşil zemin boyası üzerinde, özellikle tubuluslarda, nükleusa lokalize, sitoplazmadan net olarak ayrılan, açık-koyu kahverenkli boyanan alanlar halinde tespit edildi.

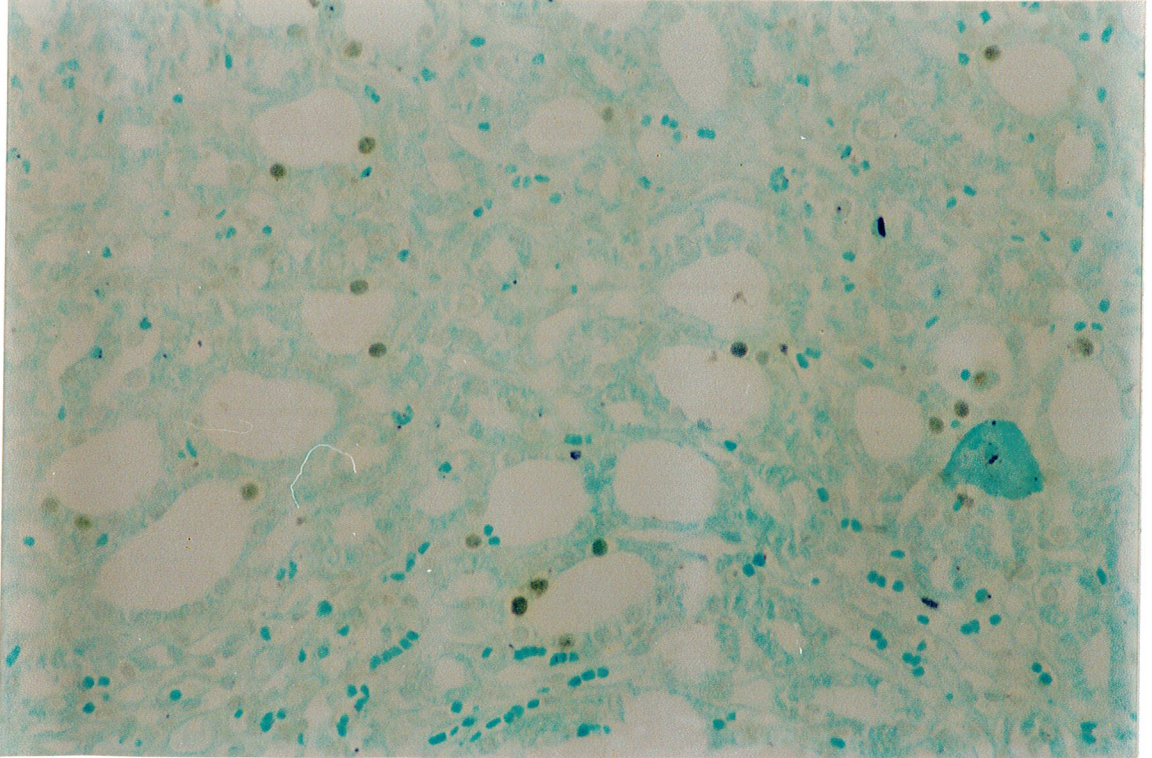
Tam obstrüksüyon grubundaki böbreklerde gelişen apoptotik hücrelerin sayısı, kısmi obstrüksüyon grubundakilere göre anlamlı olarak fazla bulundu ($p<0.05$). Tam obstrüksüyon grubunda apoptotik hücre sayısı, en düşük 3/1000 iken en yüksek 441/1000 (Tablo 3), kısmi obstrüksüyon grubunda bu sayı 2/1000 ve 170/1000 bulundu (Tablo 4). Tam obstrüksüyondaki apoptotik hücre sayısının ortalaması 190.66, kısmi obstrüksüyondaki ise 40.58 bulundu. Standart sapma ise tam obstrüksüyon grubunda 160.62, kısmi obstrüksüyon grubunda 58.63 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda apoptotik hücre saptanmadı.

Tablo 3 : Tam obstrüksüyon grubunda belirlenen apoptotik hücre sayısı

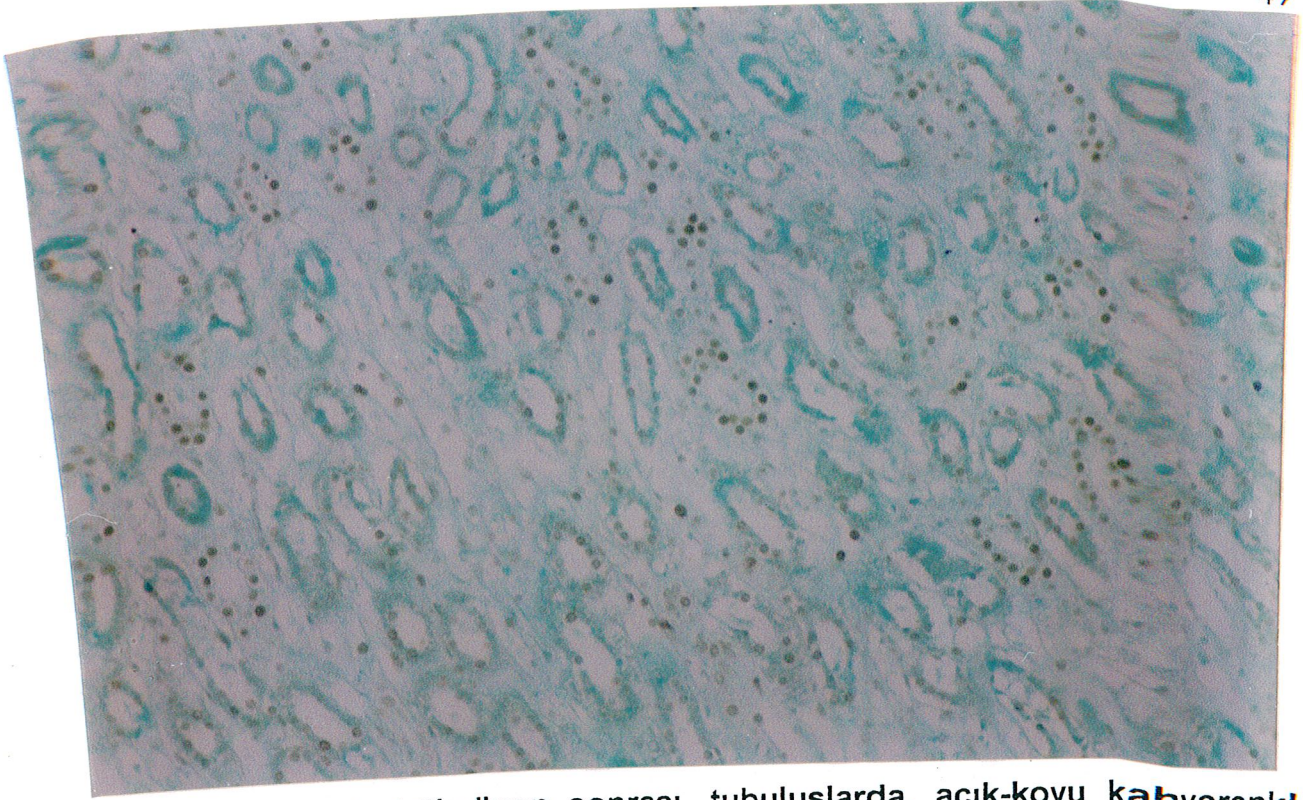
| Tam obstrüksüyon | Apoptotik hücre sayısı |
|------------------|------------------------|
| 1 | 3/1000 |
| 2 | 3/1000 |
| 3 | 3/1000 |
| 4 | 51/1000 |
| 5 | 66/1000 |
| 6 | 210/1000 |
| 7 | 219/1000 |
| 8 | 242/1000 |
| 9 | 335/1000 |
| 10 | 350/1000 |
| 11 | 365/1000 |
| 12 | 441/1000 |

Tablo 4 : Kısmi obstrüksüyon grubunda belirlenen apoptotik hücre sayısı

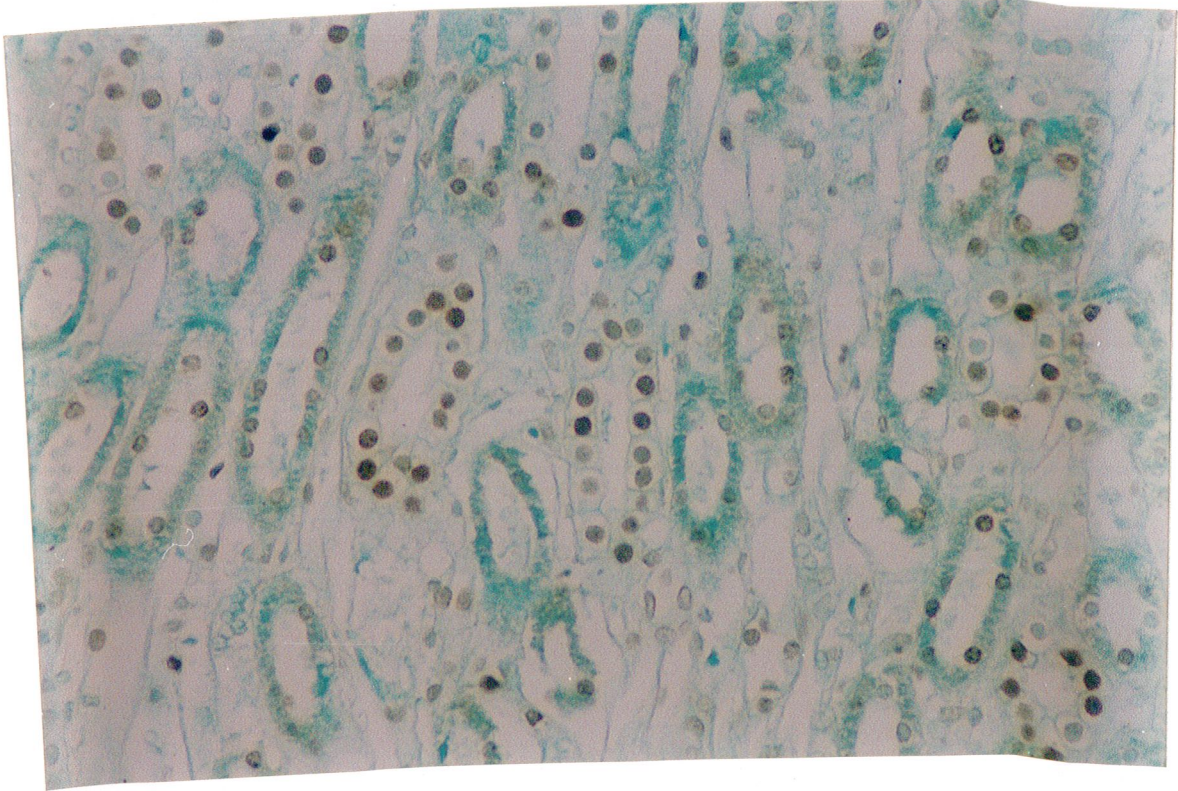
| Kısmi obstrüksüyon | Apoptotik hücre sayısı |
|--------------------|------------------------|
| 1 | 2/1000 |
| 2 | 2/1000 |
| 3 | 4/1000 |
| 4 | 5/1000 |
| 5 | 6/1000 |
| 6 | 7/1000 |
| 7 | 7/1000 |
| 8 | 18/1000 |
| 9 | 47/1000 |
| 10 | 78 /1000 |
| 11 | 141/1000 |
| 12 | 170/1000 |



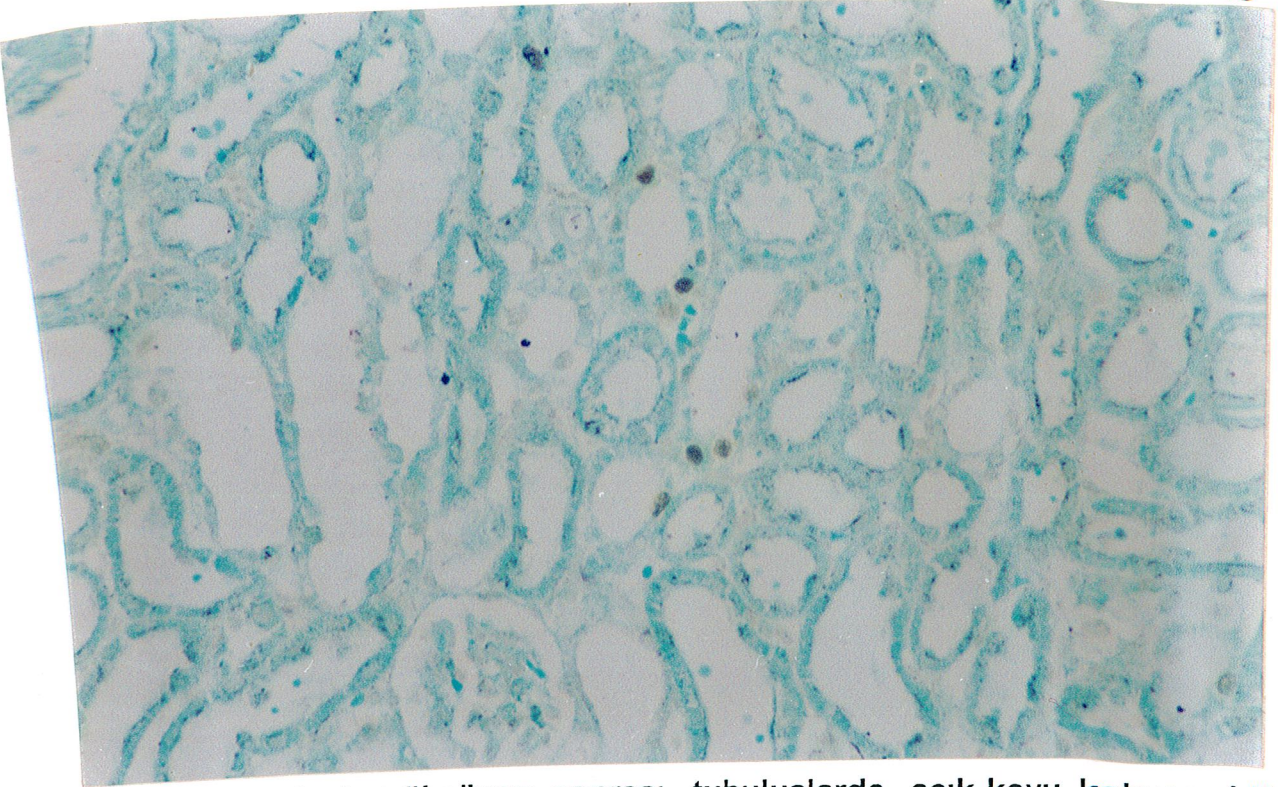
Resim 6 : Tam obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli nükleer boyanma gösteren, seyrek gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X 100)



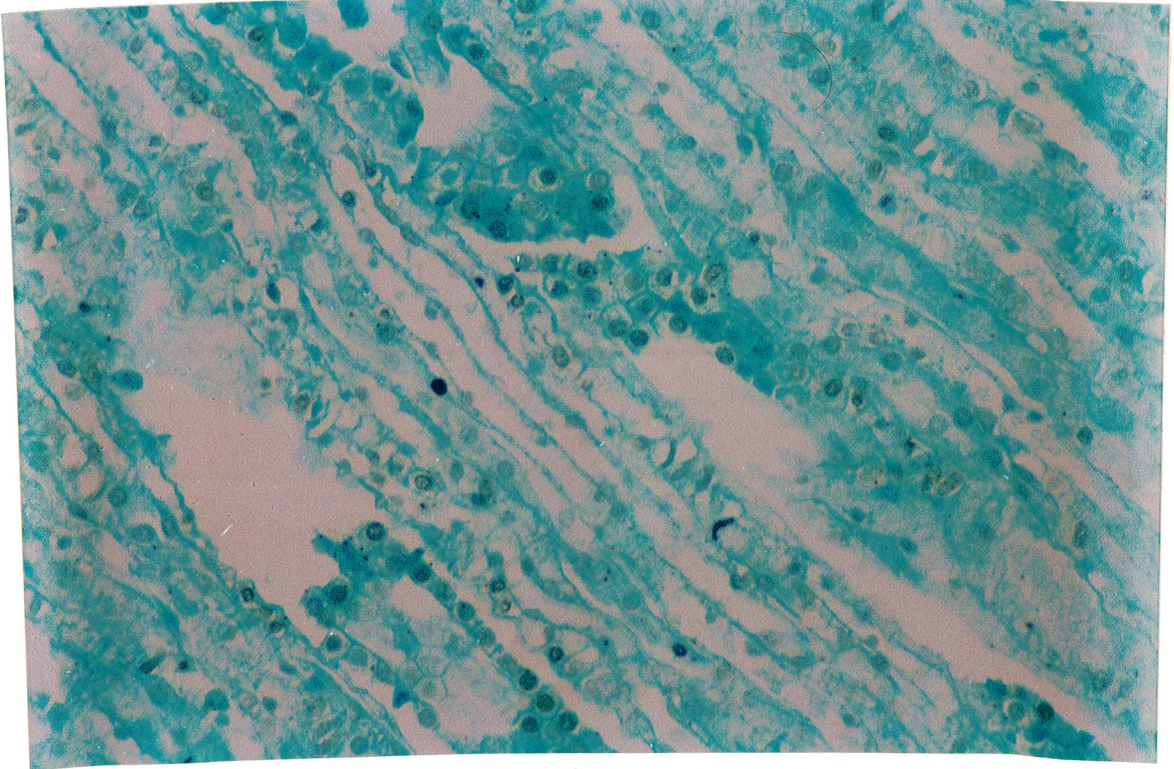
Resim 7 : Tam obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli, nükleer boyanma gösteren, sık gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X 40)



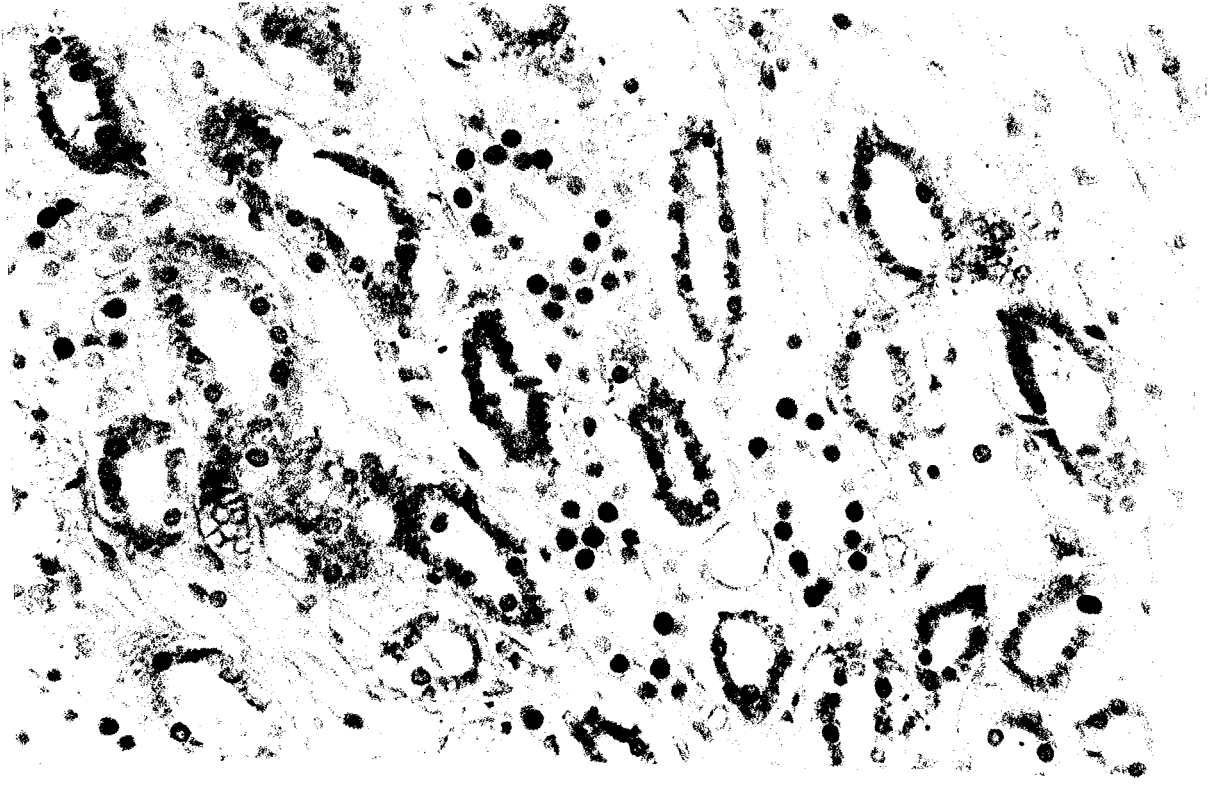
Resim 8 : Tam obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli, nükleer boyanma gösteren, sık gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X100)



Resim 9 : Kısmi obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli, nükleer boyanma gösteren, seyrek gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X 40)



Resim 10 : Kısmi obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli, nükleer boyanma gösteren, sık gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X 40)



Resim 11 : Kısmi obstrüksüyon sonrası, tubuluslarda, açık-koyu kahverenkli, nükleer boyanma gösteren, sık gözlenen apoptotik hücreler (TUNEL, X 100)

TARTIŞMA

UÜO'a bağlı kronik obstrüktif üropatide karakteristik fonksiyonel ve yapısal değişiklikler gözlenir. Üretral obstrüksüyon sonrası ilk birkaç günde GFR da azalma, renal kan akımında azalma, intertisyel ödem ve lökosit infiltrasyonu görülür. Zaman uzadıkça hidronefroz ve doku kaybı gelişir, belirgin tubuler atrofi, intertisyel fibrozis ve interstisyel inflamasyon oluşur. Ancak bu değişikliklerin patogenezi tam olarak anlaşılammıştır. Başlangıçtaki çalışmalarda bu değişiklikler, arterioller vazokonstrüksiyona, daha sonraki çalışmalarda ise lokal olarak sentez edilen sitokinlere bağlanmıştır. Bir görüşe göre hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucu bu değişiklikler oluşmaktadır. Renal hücre ölümü nekroz veya apoptozisle olur. Renal akut tubuler nekrozda olduğu gibi nekrozun baskın olduğu olaylarda normal böbrekteki hücre ölümü ve renal hastalıktaki hücre kaybı apoptozis sonucu meydana gelir (10-14).

Çalışmamızda interstisyel fibrozis, kronik inflamasyon, tubuler atrofi tam obstrüksüyon grubunda daha belirgin ve şiddetli olmak üzere, her iki grupta da izlendi. Tam obstrüksüyon grubundaki bazı böbreklerde hidronefrotik değişiklikler vardı.

Heyman ve arkadaşları, rat böbreklerinde unilateral obstrüksüyon sonucu 24 saat sonra papilla ve fornikslerde hemoraji ve nekroz gözlemişlerdir (57). Attar ve ark. fetal koyun böbreklerindeki komplet obstrüksüyondan 10 gün sonra üreterik ve pelvik dilatasyon, kortekste ödem, belirgin vasküler boşluklar, kistik yapılar ve glomerüllerde bozulma izlemişlerdir (58). Woolf ise, doğumdan önce herhangi bir nedenle obstrüksüyon geliştiğinde metanefrik epitelde proliferatif yanıt, yeni nefron oluşumu ve prekürsör hücrelerin apoptozisinin ortaya çıktığını öne sürmektedir (59). Abbate ve ark. böbrekte iskemi sonrası, birtakım moleküler aktivasyonla, endotelial lökosit hareketi ve epitelyal hücre yığılmasının gerçekleştiğini ifade etmektedir (60).

Deneyisel modellerdeki tubulointerstisyel patolojilerin değerlendirildiği bir makalede, akut fazda, tubuler epitelyal hücre zedelenmesi ve interstisyel inflamasyonunun gözlemlendiği, bu tubuler harabiyetin rejenere olabileceği gibi nekroz veya apoptozise maruz kalabildiği, kronik fazda ise renal skar oluşumunun hızlandığı

bildirilmektedir (61). Chevalier, üreteral obstrüksüyonun renal gelişim üzerindeki etkilerini değerlendirdiği bir çalışmada, kısa ve uzun süreli UÜO'daki gelişmeleri gözden geçirmiştir. Kısa süreli UÜO'da böbrekte renal displazi, fonksiyone nefron sayısında azalma, RAS'ın aktivasyonu ile vazokonstrüksüyon ve glomerüler kontraksiyon, karşı böbrekte kompensatuar hipertrofi meydana gelmekte, UÜO uzun sürdüğünde ise progresif interstisyel fibrozis sonucu böbrek gelişimi durmaktadır (31). Neonatal ratlar üzerinde yapılan bir araştırmada, 5 günlük UÜO sonucu renal vasküler, tubuler ve interstisyel zedelenmenin geri dönüşü olmayacak şekilde meydana geldiği gözlemlendi. Sağlam kalan nefronlar ve tubulointerstisyel yapıda hiperfonksiyon mekanizması ile ratların yaşamlarına devam ettiği bildirildi (62). Fetal obstrüktif üropati ve renal patolojiden dolayı ölen 15 erkek otopsisindeki böbrekler incelendiğinde, displastik ve kistik değişiklikler gözlenmiş, bunlardaki mezankimal ve tubuler hücrelerdeki apoptozisin çok yüksek seviyelere çıktığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, elde edilen veriler gestasyonel yaşla karşılaştırılmış, obstrüksüyonun süresi ve oluşumu, gestasyonel yaşla bağlantılı bulunmuştur (63).

Deneysel renal hipoperfüzyonda tubuler ve endotelial hücre harabiyeti ve tamirini içeren adaptif yanıt görülür. Bu süreçte morfolojik değişikliklerin spektrumu geniştir: atrofi, fokal nekroz, epitelyal rejenerasyon, apoptozis, inflamasyon, interstisyel fibrozis ve trombozis gelişmektedir. En şiddetli harabiyet normal dolaşımın özelliğinden dolayı dış medulla tabakasında görülmektedir. Renal iskeminin en belirgin etkileri tubuluslarda görülür, tubuler epitelyal hücreler yüksek oranda transport aktivitesinden sorumludur. Bu işlev mitokondrial fonksiyonla desteklenmektedir, oksijen azalması mitokondrial fonksiyonu şiddetli olarak etkiler (13).

Bizim çalışmamızda da korteks ile birlikte meduller tabakada etkilenim görüldü, ancak tubuler epitelyal hücrelerdeki apoptotik hücre yoğunlaşması dikkat çekici idi.

Tubuler harabiyetin mekanizması konusundaki yoğun çalışmalar epitelyal hücre kaybında 3 mekanizmayı öne çıkarmıştır: nekroz, hücre bütünlüğünün kaybı ve apoptozis (11,13). İskeminin yaygın bulgusu tubuler bazal membran rüptürüdür. Nefron tutulumu olasılıkla daha sonra gelir. Daha sonrada çevrede lokal inflamatuvar

yanıt oluşur. Akut renal iskemi sonrası oksijen metabolitlerine maruz kalan dokuda apoptozis stimule olmaktadır. Apoptoziste olayın ve fagositik mekanizmanın hızlı olması inflamatuvar veya fibrotik yanıtı neden olmamaktadır .

Sonuç olarak renal iskemiye bağlı zedelenmede tubuluslar ve kan damarları esas hedeflerdir ve genellikle en şiddetli diş medullada gözlenmektedir (13).

Bizim çalışmamızda da medulla tabakasında apoptotik hücreler belirgin olarak tespit edildi.

Kronik renal iskemideki atrofi mekanizması tam aydınlatılamamıştır. Tubuler atrofi, tubuler epitelyal hücrelerin kaybı veya küçülmesiyle olmaktadır. Apoptozis progresif iskemik atrofide olası bir mekanizmadır. Gobe ve arkadaşları unilateral renal arter stenozu sırasında ilk haftada yüksek seviyelere ulaşan apoptozisin 4 hafta daha aynı seviyelerde oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bu da apoptozisin, progresif renal hücre atrofisinde oluşan hücre kaybı mekanizmalarından birinin delili olduğuna işaret eder. Shimuzi ve Yamanaka, komplet iskemide birkaç ay boyunca apoptozisin devam ettiğini gözlemlemişlerdir. Gobe ve arkadaşları tubuler nekroz ve mitotik aktiviteyi renal arter stenozunun ilk haftasında belirgin olarak görmüşler bu yüzdende renal tubüllerin yeniden oluşum mekanizmasında apoptozisin olası rolünü öne sürmüşlerdir. Bu sav birkaç araştırmacı tarafından desteklenmiştir. Sonuç olarak atrofi kronik renal iskemilerde yaygın bir bulgudur. Tubuler hücre kaybında apoptozis rol almakla birlikte iskemik nekroz ve hiperplastik rejenerasyon sonrasında homeostatik bir mekanizma olarak öne sürülmektedir (13).

Deneyisel çalışmalarda ATN modellerinde, sıklıkla irreversible proksimal tubuler hücre ölümü görülmektedir. İskemik akut renal yetmezlikte, sadece hücre ölümü (nekroz veya apoptozis) değil, geri dönüşümlü fonksiyon kaybına neden olan hücre zedelenmeleride izlenmektedir. İskemi veya hipoksi sırasında oluşan renal tubuler hücre zedelenmesinin patofizyolojisinde, intrasellüler kalsiyum, kalsiyum bağımlı enzim Calpain, Fosfolipaz -A2 ve nitrik oksit sentetaz (NOS) ın rolü tanımlanmıştır. İntrasellüler kalsiyum ve kalsiyum iyonofmlarındaki artış, DNA parçalanmasında rolü olabilecek kalsiyuma bağlı endonükleazlar üzerinden apoptozisi uyurabilir (14).

İnsanda renal tubuler hücre hasarı subletaldir, sıklıkla da hücrelerde vakuolüzasyon ve şişme, hücre yüzey değişiklikleri ve hücre kaybı görülr.

Akut renal yetmezlikteki oliguri, tubuler obstrüksüyona patofizyolojik olarak önemli bir kanıttır. Erken dönemdeki çalışmalarda iskeminin ilk saatinde proksimal tubuler basınçtaki dramatik artış gösterilmiştir (14).

Gobe ve Axelsen tubuler hücrelerin apoptozisinin renal ağırlık kaybıyla korele olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada erken dönemde intertisyel ödem ve tubuler dilatasyon, geç dönemde intertisyel fibrozis ve şiddeti artarak giden mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenmiştir. Değişik derecelerde nekrozda izlenmiştir. Özellikle tubuler hücrelerde apoptozis izlenmiştir. Glomerüller başlangıçta normal olmakla birlikte üriner boşlukların büyümesiyle hafif glomerüler kollaps gelişmiştir, karşı böbrek veya sham böbreğinde anlamlı histolojik değişiklik gözlenmemiştir. Apoptozis 6.günden sonra tubuler hücrelerde hızla artmış, 25 .günde pik yapmıştır. Daha sonra 43.güne kadar hızla azalmış, bu azalma deney sonuna kadar devam etmiştir. Tubuler apoptozis başlangıçta iç medullada, 15.günde medulla çıkışında, 25.günde hem korteks hem medullada gözükümüştür. Karşı böbrek ve kontrol böbreklerde tubuler apoptozis düşük kalmıştır. Apoptotik intertisyel hücreler deney periyodu sürecinde artmışlardır. Bununla birlikte intertisyel fibroblastlar, damar duvar hücreleri apoptotik hücrelere eşlik etmektedir. İntertisyel inflamatuvar hücreler karşı böbrek ve kontrilateral intertisyel hücre apoptozisiyle benzerdir. Glomerüler hücrelerde apoptozis nadir olup anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu çalışmada kronik obstrükte böbreklerde tubuler, intertisyel ve glomerüler hücre apoptozisinde belirgin farklılık gözlenmiştir (11).

Bizim çalışmamızda da, karşı böbrekte anlamlı histopatolojik değişiklik izlenmedi ve glomerüllerde belirgin patoloji saptanmadı. Ayrıca özellikle tubuler hücrelerde apoptozis saptandı. Apoptotik hücreler, bu çalışma ile uyumlu olarak, korteks ve medullada saptandı. Ancak, interstisyel fibroblastlar ve damar duvarlarında apoptotik hücrelere pek rastlanmadı.

Gobe ve Axelsen, TOÜ'de tubuler atrofinin nedeni olarak tubuler hücre apoptozisini öngörmüşlerdir (11). Tubuler apoptozis ile böbrek ağırlığının azalması arasında net ilişki görülmüştür (11,43). En önemli gözlemlerden birisi tubuler hücre apoptozisi ile tubuler hücre proliferasyonunun paralel seyretmesi ve hemen hemen aynı zamanlarda pik yapması olmuştur. İntertisyel hücre apoptozisinde intertisyel hacimle paralel artış göstermektedir (11,43). TOÜ' de daha önceki çalışmalarda

gösterildiği gibi glomerüler yüzey alanında hafif azalma dışında anlamlı değişiklik görülmemiştir (11).

Bizim çalışmamızda da glomerüllerde apoptozis veya herhangi bir patolojik değişiklik izlenmedi.

Kronik obstrüktif üropatide hücre proliferasyonu ve apoptozis, tubuler, interstisyel ve glomerüler hücrelerde tanımlanmıştır. Çoğu deneysel modelde obstrüktif üropatide, tubuler hücre apoptozisi, üreter ligasyonundan hemen sonra gelişir. 7 ve 24. günlerde pik yapar. Apoptozis başlangıçta dilate toplayıcı kanallarda oluşur sonra diğer tubuluslara yayılır. Tubuler hücre apoptozisi muhtemelen obstrüktif üropatide renal doku kaybına neden olmaktadır, böbrek ağırlığının azalması ile apoptozisin şiddeti arasında korelasyon mevcuttur. Tubuler hücre proliferasyonunda üreter ligasyonundan hemen sonra başlar, 6.günde pik yapar ve hızlıca bazal düzeyine iner ancak apoptozis, düzeyini korumaya devam etmektedir. Bu yüzden tubulus hücre proliferasyonu ile apoptozisi arasında patolojik bağlantı kurulamamaktadır. İnterstisyel hücre apoptozisi obstrüktif üropati süresince artarak devam eder. İnterstisyel hücre proliferasyonu 2 pattern göstermektedir. Erken dönemde tubuler hücre proliferasyonu ve çoğu fibroblast proliferasyonu piki, 2.pik ise çoğu inflamatuvar hücre proliferasyonudur. Glomerüler hücre proliferasyonu ve apoptozisi kontrolden farklı değildir. Obstrüktif üropatide hücre apoptozisi ve proliferasyonu iyi bilinmekle birlikte moleküler kontrolü iyi anlaşılammıştır. Ancak doğaldır ki hücre proliferasyonunun ve apoptozisinin denge mekanizmaları moleküler seviyede oluşmaktadır. Bunlardan bazıları deneysel modellerde anlaşılmmıştır (43). Tanji ve ark.ları rat böbrekleri üzerindeki çalışmalarında TUNEL metodunu kullandılar ve UÜO'u takiben medulla ve kortekste apoptozisin arttığını gözlediler. Medulladaki artış geçici (4 günlük) iken kortekste artış 3 hafta sürmektedir. Glomerüllerde apoptozis yoktur (64). Bir başka deneysel çalışmada, 24 saat ve 2 haftalık iskemi sonrası apoptotik hücre sayısı pik yapmakta ve 4. haftadan sonra azaldığı bildirilmektedir. Hücre zedelenmesi proksimal tubulus epitelinde daha belirgindir. İskemi sonrası reperfüzyonda, proksimal tubuluslarda 3-6 günde epitelyal hiperplazi geliştiği ve bunların çoğunun S-fazı hücrelerin aktif periyodunda olduğu görülmektedir. Daha sonraları ise epitel hücre sayısında azalma görülmüş ve bu

azalmanında 2 haftalık iskemi sonrası apoptozisle gerçekleşmiş olduğu yorumlanmıştır. Renal zedelenmede apoptozis önemli rol oynamaktadır. Glomerüler sklerozisteki hücre kaybı ile apoptozis yoğunluğu beraberdır. UO'daki tubuler atrofi de apoptozisle gerçekleşir. Glomerüller ve renal interstisyumdaki infiltratif lökositler inflamasyon süresince apoptozise gider. Bu yüzden, çoğu böbrek hastalığında apoptozis önemli rol oynar ve bu bozuklukların tedavisinde apoptozisin dengelenmesi öngörülür (66). Gobe ve ark.nın deneysel çalışmasında, unilateral iskemik renal atrofideki hücresel değişiklikler gözönüne alınarak akut ve kronik faz değerlendirilmiştir. Akut fazda (2-8gün) apoptozis veya nekroz ile meydana gelen hücre ölümü artmaktadır. Tubulus epitelleri dayanıksızdır, mitoz aktivitesi yüksektir. Kronik fazda (10-28 gün) hücre ölümü sadece apoptozisledir. Böbrek küçülmektedir. Tubulus epitel dayanıklılığı ve mitoz aktivitesi normale dönmektedir. Epitel içi makrofajlar ortaya çıkmaktadır. Atrofik tubuluslardaki epitelyal hücrelerdeki proliferatif çoğalma durmaktadır ve bu apoptozisle açıklanmaktadır (67). Gobe ve Axelsen, ratlarda deneysel hidronefroz sonucu gelişen renal tubuler atrofiyi değerlendirdikleri çalışmada, böbrekteki progresif doku kaybının üreter ligasyonundan 1 hafta sonra oluştuğunu ve 2-4 hafta arası hızlandığını bildirmektedirler. Bu dönemde apoptotik hücre sayısında en yüksek seviyelerine çıkmaktadır. Hidronefrozla birlikteki renal tubuler atrofi patogenezinde hücre kaybında apoptozisin önemli rol oynadığına inanmaktadırlar (68). Renal iskemi sonrası tubuluslardaki harabiyetin ve onarımının apoptozisle bağlantısının değerlendirildiği bir çalışmada rat böbreklerinde, 4 haftalık iskemi sonucu apoptotik hücre sayısının yükseldiği gözlemlendi. Bunun 24 saat ve 2 haftalık iskemilerdeki proksimal tubuluslarda hiperplaziye uğrayan epitel hücrelerinin apoptozis nedeniyle dökülmesinden dolayı gerçekleştiği öne sürülmektedir (65).

Bir başka çalışmada, kısmi ve tam obstrüksüyon bulguları araştırılmıştır. Kısmi üreteral obstrüksüyonda başlangıçtan 3 haftaya kadar sürekli artan apoptozis gözlemlendi. Bu artış tam üreteral obstrüksüyonda gözlenen seviyenin %65 kadardı (37). Bizim çalışmamızda da tam obstrüksüyondaki apoptotik hücre sayısı, kısmi obstrüksüyondakine nazaran çok daha fazla bulundu. Kısmi obstrüksüyonda, tam üreteral obstrüksüyonu takiben oluşan apoptotik yanıt karşılaştırıldığında apoptozisin daha düşük şiddette ve geç zamanda başladığı da gözlemlenmiştir.

Deneysel üreter ligasyonundan sonra böbrekte hidronefroz gelişmektedir. Özellikle distal tubuler epitelde oluşan apoptozis renal atrofi sonucu hidronefroza yol açar . Araştırmaların bir kısmında kısmi üreteral obstrüksiyonun renal parankim üzerinde etkileri olduğu söylenmektedir. Bazı deneysel çalışmalarda da parsiyel üreteral obstrüksiyonda, hidronefroz gelişiminden bahsedilmekte birlikte renal morfoloji ve fonksiyon üzerindeki etkinin şiddeti daha azdır(37).

Bizim çalışmamızda da KÜO grubunda, parankimdeki değişiklikler daha hafif izlendi. Hidronefroza giden böbrek saptanmadı.

Araştırmacılarından bazıları ise KÜO'da glomerüler hacmin azaldığı, tubuler dilatasyonla birlikte progresif glomerüler sklerozunda geliştiğini sonuçta tubuler atrofi ve interstisyel fibrozisin meydana geldiğini söylemektedirler (37). Bizim KÜO grubunda da, TÜO grubundaki böbreklere göre, interstisyel fibrozis ve tubüler atrofi daha hafif olarak izlendi. Bu çalışmada TÜO' da apoptoziste progresif artış görülmektedir. TÜO'da 3 haftalık zaman sonunda renal parankimin normal yapısının bozulduğu, toplayıcı ve distal tubullerin genişlediği ve bu dilate tubullerde dramatik olarak apoptozis gözlemlendiği söylenmektedir. Parsiyel obstrükte böbrekte renal parankim korunmakla birlikte tubulus dilatasyonu mevcuttu ancak apoptotik nükleer boyanma hafif dilate tubuluslarda gözlemlendi. Bu karakteristik değişiklikler parsiyel veya komplet obstrüksiyonda ilk 1 haftada gözükmüş olmakla birlikte obstrüksiyonun her bir haftasında yoğunluk giderek artmaktadır (37).

Gerçekten bizim çalışmamızda da, tam obstrüksiyon grubunda belirgin fibrozis, kronik inflamasyon, kistik ve atrofik tubuluslar vardı. Kısmi obstrüksiyon grubunda ise tubulus dilatasyonu ve interstisyel fibrozis gözlemlendi. Ancak, bunlar tam obstrüksiyon grubuna göre daha hafif idi.

Morfolojik ve fonksiyonel çalışmaların birkaçında KÜO'da, 3 haftalık periyodunda progresyon izlenmemiştir. Bir kısmında ise kan akımının ve glomerüler filtrasyonun belli oranlarda dengelendiği iddia edilmektedir. Erişkin hayvanlar üzerindeki çalışmaların bazılarında KÜO'u takiben normal GFR' na geri döndüğü ifade edilmektedir. Benzer olarak sütten kesilmemiş ratlarda da aynı bulgu gözlemlenmiştir. Bu morfolojik değişiklikler sırasında karşı böbrekte renal parankim harabiyeti veya kompanseuar hipertrofi gözlemlenmemiştir (37). Bizim çalışmamızda da

karşı böbreklerde parankim harabiyeti, fibrozis, inflamasyon, tubuler atrofi, glomerüler skleroz gibi renal morfolojiyi bozan patolojik olaylar izlenmedi.

SONUÇ

Çalışmamızda, tam obstrüksüyon grubunda, bazı olgularda makroskopik olarak izlenen hidronefrotik değişiklikler mikroskopik seviyede de izlendi. Dokuların çoğunda, interstisyel fibrozis ve mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu vardı. Bir olguda kalsifikasyon ve yağlanma görüldü. Tubulusların bir kısmında kistik atrofi, bir kısmında dilatasyon ve distorsiyon gözlemlendi. Bazı tubulus epitel hücrelerinde nükleuslarda dejeneratif değişiklikler izlendi. Olguların bir kısmında damar duvarlarında kalınlaşma, bazı damar lümenlerinde eritrosit birikimi izlendi. Bir kısmında ise özellikle damar çevresinde yoğunlaşan ve yer yer endoteli bozan inflamatuvar infiltrasyon dikkati çekti. Kısmi obstrüksüyon grubunun HE kesitlerinde olguların bir kısmında, interstisyumda fibrozis ve mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu izlendi. İltihabi hücre infiltrasyonu bazı olgularda damar çevrelerinde yoğunlaşmıştı. Damarların bir kısmında lümende eritrosit gölcükleri izlendi. Bir olguda parankimde kanama ve nekrotik alanlar görüldü. Tubulusların bir kısmı distorsiyone idi ve epitelindeki hücrelerde hafif nükleer dejenerasyon ve vakuolizasyon gözlemlendi.

Tam obstrüksüyon ve kısmi obstrüksüyonun patolojik bulgularına bakıldığında, genelde tam obstrükte böbreklerde fibrozisin, tubuluslardaki etkilenmenin daha şiddetli olduğu görüldü. Bazı tam obstrükte böbreklerde makroskopik olarak ta hidronefrotik değişiklikler tespit edildi. Kısmi obstrüksüyon grubundaki böbrek dokularında, bu değişiklikler daha sınırlı ve hafif şiddetli idi. Kontrol böbrek kesitlerinde ise, belirgin bir patolojik bulgu görülmemektedir.

TUNEL yöntemi ile özellikle tubuluslarda apoptotik hücreler görüldü. Bunlar iyi sınırlı, yuvarlak veya ovoid, açık-koyu kahverenkli yoğun kromatinli, küçük nükleuslar halinde gözlemlendi. Apoptotik hücrelerin en fazla olduğu alanlar seçildi ve büyük büyütmede 1000 hücre sayılarak, bunlardan kaç tanesinin apoptozise uğradığı tespit edildi.

Tam obstrüksüyon grubunda, kısmi obstrüksüyon grubuna göre, apoptotik hücre sayısı anlamlı olarak daha fazla saptandı ($p<0.05$). Tam obstrüksüyondaki apoptotik hücre sayısının ortalaması 190.66, kısmi obstrüksüyondaki ise 40.58 bulundu. Standart sapma ise tam obstrüksüyon grubunda 160.62, kısmi

obstrüksüyonda 58.63 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda apoptotik hücre saptanmadı.

Sonuç olarak, tam obstrüksüyonda, kısmi obstrüksüyona nazaran daha şiddetli patolojik değişiklikler ile paralel olarak apoptotik hücre sayısının da çok daha fazla olduğu gözlenmekle birlikte apoptotik değişikliklerin zamanla ilişkisini göstermek amacıyla belirli zaman aralıklarında yapılan obstrüksiyon neticesinde oluşan değişikliklerin karşılaştırılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Üreteral obstrüksüyon, çocuklarda obstrüktif üropatinin önde gelen nedenlerinden biridir. Böbrek üzerinde gelişen morfolojik değişiklikler, obstrüksüyonun derecesine, şiddetine ve süresine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Obstrüktif böbrek dokusunda interstisyel fibrozis, şiddeti değişen tubuler harabiyet, iltihabi infiltrasyon, hidronefrotik, kistik ve atrofik değişiklikler, kanama, nekroz gözlenebilir. Bazende böbreğin tam kaybına kadar ilerleyebilir.

Obstrüktif nefropatide, mekanizma renal hücre zedelenmesi ve ölümüdür. Renal hücre ölümü, renal hücre nekrozu ve renal hücre apoptozisi ile oluşmaktadır. Renal hücre nekrozu, HE ile boyanmış preparatlarda değerlendirilebilen bir morfolojik görüntüdedir. Ancak apoptozis, dokuda HE ile boyanmış preparatlarda nadiren görülür.

Bu çalışmada, öncelikli amacımız, yeni bir yöntem olan TUNEL yöntemi ile kısmi ve tam obstrüksüyona uğratılmış böbrek dokularında gelişen renal hücre apoptozisini göstermek ve değerlendirmektir. Ayrıca obstrüktif nefropatide oluşan histopatolojik değişiklikleride yeniden gözden geçirmektir.

Kısmi obstrüksiyon grubundan 12 adet, tam obstrüksüyon grubundan 12 adet ,kontrol grubundan 5 adet tavşan böbreğinin parafin bloklarından elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler TUNEL metodu ile boyandı. Ayrıca HE ile de boyandı. Tam obstrüksüyon grubu böbrek dokusunun HE preparatlarında, interstisyel fibrozis, kronik iltihabi infiltrasyon, tubuler harabiyet, kistik ve atrofik tubuluslar belirgin olarak gözlemlendi. Bazı olgularda hidronefrotik değişiklikler belirgindi. Kısmi obstrüksüyon grubundaki böbrek dokularında, bu değişiklikler daha sınırlı ve hafif şiddetli idi. Kontrol grubu böbreklerde ise normal histolojiye yakın böbrek dokuları izlendi.

TUNEL yöntemi ile özellikle tubuluslarda apoptotik hücreler görüldü. Bunlar iyi sınırlı, yuvarlak veya ovoid, açık-koyu kahverenkli, yoğun kromatinli, küçük nükleuslar halinde gözlemlendi. Apoptotik hücrelerin en fazla olduğu alanlar seçildi ve büyük büyütmede 1000 hücre sayılarak, bunlardan kaç tanesinin apoptozise uğradığı tespit edildi. Tam obstrüksüyon grubunda, kısmi obstrüksüyon grubuna göre, apoptotik hücre sayısı anlamlı olarak daha fazla saptandı ($p<0.05$). Kontrol grubundaki tavşan

böbreklerinde tek, tük apoptotik hücre gözlendi. Çalışmamızda yeni, duyarlılığı ve özgünlüğü yüksek olan TUNEL yöntemi, parafin bloklardan elde edilen kesitlerde başarı ile uygulanmıştır. Kısmi ve tam obstrüksüyondaki apoptozis şiddetinin farklılığı gösterilmiştir.

SUMMARY

Uretaral obstruction is the most common cause of obstructive uropathy in children. Morphologic changes in kidney vary according to degree severity and duration of obstruction. Interstitial fibrosis, tubular damage with changing severity inflammatory infiltration, hydronephrotic, cystic and atrophic changes, bleeding, necrosis is seen in obstructive kidney tissue. And sometimes it causes total kidney loss.

Mechanism of obstructive nephropathy is renal cell damage and death. Renal cell death is formed by renal cell necrosis and renal cell apoptosis. Renal cell necrosis can be evaluated in H.E stained sections. But apoptosis is rarely seen on H.E stained sections.

In this study we aimed to demonstrate and evaluate renal cell apoptosis in partially and totally obstructed renal tissue by using TUNEL method. Moreover we reviewed the histopathologic changes in obstructive nephropathy. Five micron thickness sections were gotten from paraffin blocks of 12 partially obstructed rabbit kidneys and 12 totally obstructed rabbit kidneys and these sections were stained by using TUNEL method. And they were also stained with HE. In totally obstructed kidney tissues stained with HE, interstitial fibrosis, chronic inflammatory infiltration, tubular damage, cystic and atrophic tubules were marked. In some cases hydronephrotic changes were significant. In partially obstructed kidney tissues these changes were limited and mild degree. In control group kidney tissues normal histology was observed. Especially apoptotic cells in tubules were observed by using TUNEL method. Those were observed to have round or ovoid, light-dark brown with orderly bordered nucleus dense chromatin. Fields with dense apoptotic cells were chosen and in high-power field 1000 cells were counted and number of apoptotic cells were detected. In totally obstructed group number of apoptotic cells were significantly higher than in partially obstructed group ($p < 0.05$). In control group of rabbit kidneys a few apoptotic cells were observed.

In our study TUNEL method which is a new, sensitive and specific method was applied successfully on sections gotten from paraffin blocks and the difference of severity of apoptosis in partial and total obstruction was demonstrated.

KAYNAKLAR

- 1- T.W. Sadler. Urogenital system , Langman's Medical Embryology (6th ed.), Baltimore, Williams-Wilkins, 1990, 260-296.
- 2- İ. Petorak. Ürogenital sistem, Medikal Embriyoloji (2.baskı), İstanbul, Beta, 1986, 212-219.
- 3- S.Yaman, O.Göğüş, Y.Müftüoğlu. Ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı, Y.Müftüoğlu, Üroloji; Ankara Tıp Fakültesi (1.baskı), 1990, 1-23.
- 4- W.L.Clapp, B.P.Crocker. Adult Kidney. Stephan.S.Sternberg, Histology for Pathologist (2th ed.), Philadelphia, Lippincot-Raven, 1997, 799-835.
- 5- Micheal H.Ross, Edward J.Reith. Urinary System, Histology, A Text and Atlas (1th ed.), Philadelphia, W.B.Saunders Company, 1985, 528-560.
- 6-Türkan Erbeni. Üriner Sistem, Histoloji 2 (2. Baskı), İstanbul Tıp Fakültesi, 1985, 121-152.
- 7- Ramzi S.Cotran, Vinay Kumar, Tucker Collins. Kidney, Obstructive Uropathy, Robbins, Pathologic Basis of Disease, (6th ed.), Philadelphia, W.B.Saunders Company, 1998, 988-989.
- 8-A.B. Retik, D.Vauphan, A. Wein. Pathophysiology of Urinary tract obstruction, Campbell's Urology (7th ed.), Philadelphia, Lippincot-Raven, 1998, 342-379.
- 9- S. Yaman. O. Göğüş, Y. Müftüoğlu. Üriner obstrüksiyonlar, Temel Üroloji, Ankara Tıp Fakültesi (3. Baskı), 1998, 269-294.
- 10- Chevalier R. Pathophysiology of Obstructive Nephropathy in the Newborn. Seminar Nephrology 1998; 18; 585-593.
- 11- Truong L, Petrusevska G, Yang G, Gurpınar T, Shappell S, Lechago J et all. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. Kidney Int. 1996; 50; 200-207.
- 12- Nissenson AR. Acute renal failure: definition and pathogenesis. Kidney Int Suppl 1998 May; 66; 7-10.
- 13- Faul F Shanley. The pathology of Chronic Renal Ischemia. Seminars in Nephrology 1996; 16 (1); 21-32.

- 14- Edelstein CL, Ling H, Sehrier RW. The nature of renal cell injury. *Kidney Int*; 1997; 51(5); 1341-51.
- 15- Ramzi S, Cotran, Vinay Kumar, Tucker Collins. Cellular pathology I: Cell injury and cell death. *Robbins. Pathologic Basis of Disease (6th ed.)*. Philadelphia, W.B.Saunders Company, 1998: 1-29.
- 16- Ivan Damjanov, James Linder. Cell Injury and Cellular Adaptations. *Anderson's Pathology (10th ed.)*. St.Louis, Mosby, 1996; I (17); 357-386.
- 17- Parakrama Chandrasoma, Clive R. Taylor. Cell degeneration and necrosis, *Concise pathology (3th ed.)*, St.Louis, Mosby, 1998; I, 3-20.
- 18- Margaret C. Cummings, Clay M. Winterford, Neal I. Walker, Stephan.S.Sternberg. Apoptosis. *Histology for Pathologist (2th ed.)*. Philadelphia, Lippincot-Raven, 1997, 3-19.
- 19- John F.Kerr, Clay M.Winterford, Brian V.Hormon. Apoptosis, Its Significance in Cancer and Cancer Therapy. *Cancer*. 1994; 73 (8); 2013-2023.
- 20- Takeda M, Suzuki Y, Obara N, Nagai Y. Apoptosis in mouse taste buds after denervation. *Cell Tissue Res*. 1996; 286:55-62.
- 21- Masuichi H, Seki S, Kitade T, Kawada N, Sakaguchi H, Nakatani K et all. Significant role of apoptosis in type-1 autoimmune hepatitis. *Osaka City Med* 1999; 45(1):61-79.
- 22- Borrás D, Pumarola M, Ferrer I. Neuronal nuclear DNA fragmentation in the aged canine brain:apoptosis or nuclear DNA fragility? *Acta Neuropathol* 2000; 99(4) 402-8.
- 23- Elsasser A, Suzuki K, Schaper J. Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32(5):711-724.
- 24- Takashi E, Ashraf M. Pathologic assesment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32(2):209-24.
- 25- Yaoita H, Oagawa K, Maehara K, Maruyama Y. Apoptosis in relevant clinical situations:contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc* 2000; 45 (3):630-41.

- 26- Ma J, Nishimura H, Fogo A, Kon V, Inagama T, Ichikawa I. Accelerated fibrosis and collagen deposition develop in the renal interstitium of angiotensin type 2 receptor null mutant mice during ureteral obstruction. *Kidney Int.* 1998; 53(4):937-44.
- 27- Chevalier RL. Molecular and cellular pathophysiology of obstructive nephropathy. *Pediatr Nephron* 1999; 13(7):612-9.
- 28- Chevalier RL. Obstructive nephropathy: lessons from cystic kidney disease. *Nephron* 2000; 84(1):6-12.
- 29- Chevalier RL. Growth factors and apoptosis in neonatal ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7 (8):1098-105.
- 30- Chevalier R, Chung K, Smith C, Ficenc M, Gomez A. Renal apoptosis and clusterin following ureteral obstruction role of maturation. *J Urology* 1996; 156:1474-1479.
- 31- Chevalier RL. Effects of ureteral obstruction on renal growth. *Semin Nephrol* 1995; 15(4):353-60.
- 32- Hughes J, Johnson RJ. Role of Fas(CD95) intubulointerstitial disease induced by unilateral ureteric obstruction. *Am J Physiol* 1999; 277(1-2) : 26-32.
- 33- Hughes J, Brown P, Shankland SJ . Cyclin kinase inhibitor p21CIP1/WAF1 limits interstitial cell proliferation following ureteric obstruction. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 2): 948-56.
- 34- Kennedy WA, Buttyan R, Garcia-Montes E, D'Agati V, Olsson CA, Sawczuk IS. Epidermal growth factor suppresses renal tubular apoptosis following ureteral obstruction. *Urology* 1997; 49(6):973-80.
- 35- Chevalier R, Goyal S, Wollstenholme J, Thornhill B. Obstructive nephropathy in the neonatal rat is attenuated by epidermal growth factor. *Kidney Int.* 1998; 54:38-47.
- 36- Glynne PA, Evans TJ. Inflammatory cytokines induce apoptotic and necrotic cell shedding from human proximal tubular epithelial cell monolayers. *Kidney Int* 1999; 55(6):2573_97.
- 37- Kennedy W, Stenberg A, Lackgren G, Hensle T, Sawczuk S. Renal tubular apoptosis after partial ureteral obstruction: *J Urology* 1994; 152:658-664.

- 38- Ricardo SD, Diamond JR. The role of macrophages and reactive oxygen species in experimental hydronephrosis. *Semin Nephrol* 1998 ; 18(6):612-21.
- 39-Turner T, Tung K, Tomomasa H, Wilson L. Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat. *Biology Rep.* 1997; 57:1267-1274.
- 40-Li H, Jiang Y, Rajpurkar A, Dunbar J, Dhabuwala B. Cocaine induced apoptosis in rat testes. *J Urology* 1999; 162:213-216.
- 41-Yu DS, Char DL, Chang SY, Ma CP. Pathogenesis of ischemia reperfusion injury of the kidney after transient renal arterial clamping in rats. *J Formos Med Assoc* 1998; 97 (9):606-13.
- 42- Amore A, Emancipator SN, Cirina P, Conti G, Ricotti E, Bagheri N, Coppo R. Nitric oxide mediates cyclosporine induced apoptosis in cultured renal cells. *Kidney Int* 2000; 57(4):1549-59.
- 43-Truong LD, Sheikh-Hamad D, Chakraborty S, Suki WN. Cell apoptosis and proliferation in obstructive uropathy. *Semin Nephrol* 1998; 18(6):641-51.
- 44- Chevalier RL, Goyal S, Kim A, Chang AY, Landau D, LeRoith D. Renal tubulointerstitial injury from ureteral obstruction in the neonatal rat is attenuated by IGF-1. *Kidney Int* 2000; 57(3):882-90.
- 45-Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gordon K, Hughes J, Pichler R, Brown P et al. Obstructive uropathy in the mouse :role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int* 1999; 56(2):571-80.
- 46-Chevalier RL, Smith CD, Wolstenholme J, Krajewski S, Reed JC. Chronic ureteral obstruction in the rat suppresses renal tubular bcl-2 and stimulates apoptosis. *Exp Nephrol* 2000; 8(2):115-22.
- 47- Terasaka H, Tamura A, Takayama F, Kashimata M, Ohtomo K, Machino M et al. Induction of apoptosis by dopamine in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* 2000; 20 (1a):243-50.
- 48- Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, Atsumi T, Toguchi M. Induction of apoptosis by flavones, flavonols (3-hydroxyflavones) and isoprenoid –substituted flavonoids in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res.* 2000, 20(1a):271-7.
- 49- Masahiko Koike. Significance of spontaneous apoptosis during colorectal tumorigenesis. *J Surgical Oncology* 1996 ; 62:97-108.

- 50- Negoescu A, Lorimier P, Labat-moleur F, Drout C, Robert C, Guillermet C et al. In situ apoptotic cell labeling by TUNEL method:improvement and evaluation on cell preparations. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* .1996; 44(9); 959-968.
- 51- Gavrieli Y, Sherman Y, Shmuel A, Sasson B. Identification of programmed cell death in situ via specific Labeling of nuclear DNA fragmentation. *J.Cell Biology* 1992; 119:493-501.
- 52- Colecchia M, Frigo B, Del Boca C, Guardamagna A, Zucci A , D Colloi et all. Detection of apoptosis by TUNEL technique in clinically localized prostatic cancer before and after combined endocrine thrapy. *J.Clin Pathol* 1997; 50: 384-388.
- 53- Harn J, Shaen K, Yu YC, Chiu SC, Lee W H. Apoptosis occurs more frequently in intraductal carcinoma than in infiltrating duct carcinoma of Human breast cancer and correlates with altered p53 expression : detected by terminal – deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-FITC nick labeling (TUNEL). *J Histopathology* 1997; 31:534-539.
- 54- Umemura S, Yasuda M, Osamura Y, Kawarada Y, Sugiyama T, Tsutsumi Y. Enhancement of TdT-Biotin Nick end –labeling (TUNEL) method using mung bean nuclease, a single stranded DNA digestion enzyme. *J Histochemistry and Cytochemistry* 1996, 44:125-132.
- 55- Popovska S, Van Dierendonck JH, Baichev G, Deliiski T. The TUNEL technic for demonstrating apoptosis on parafinn sections. *Akush Ginekol* 1999; 38(2):37-9.
- 56- Mangili F,Cigala C,Santambrogio G. Staining apoptosis in parafin sections. Advantages and limits. *Anal Quant Cytol Histol* 1999; 21 (3) :273-6.
- 57- Heyman SN, Funchs S, Jaffe R, Shina A, Ellezien L, Brezis M, Rosen S. Renal microcirculation and tissue damage during acute ureteral obstruction in the rat:effect of saline infusion, indomethacin and radiocontrast. *Kidney Int* 1997; 51 (3):653-63.
- 58- Attar R,Quinn F, Winyard P, Foxall P, Hanson MA, Wolf AS. Short term urinary flow impairment deregulates PAX2 and PCNA expression and cell survival in fetal sheep kidneys. *Am J Pathol* 1998; 152 (5):1225-35.
- 59-Woolf As. Emerging roles of obstruction and mutations in renal malformations. *Pediatr Nephrol* 1998; 12(6):690-4.
- 60- Abbate M, Remuzzi G. Acceleration of recovery in acute renal failure:from cellular mechanisms of tubular repair to innovative targed therapies. *Ren Fail* 1996; 18(3):377-88.

- 61- Eddy A. Experimental insight into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesions. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1994; 5(6):12373-87.
- 62- Chevalier RL, Kim A, Thornhill BA, Wolstenholme JT. Recovery following relief of ureteral obstruction in the neonatal rat. *Kidney Int* 1999; 55(3):793-807.
- 63- Poucell-Hatton M, Huang M, Bannykh S, Benirscke K, Masliah E. Fetal obstructive uropathy:Patterns of renal pathology. *Pediatr dev Pathol* 2000; 3 (3) :223-31.
- 64- Tanji N, Yokoyama M, Terade N, Shudo M, Takeuchi M. Renal tubuler apoptosis after release of ureteral obstruction in the rat kidney. *Int.J.Urol* 1998; 5(3):256-61.
- 65-Takeda T. A pathomorphological study on damage and repair process of tubuli after renal ischemia. *Ped.Nephrol* .1996; 38(11):493-501
- 66- Sugiyama H, Kashihara N, Makino H. Role of apoptosis in renal injury. *Nippon rinsho* 1996 Jul; 54(7):1975-81.
- 67- Gobe GC, Axelsan RA, Searle JW. Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab.Invest* 1990; 63(6):770-9.
- 68-Gobe GC, Axelsan RA. Genesis of renal tubular atrophy in experimental hydronephrosis in the rat .Role of apoptosis.*Lab Invest* 1987; 56(3):273-81.