



T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**PRİMER VEZİKOÜRETERAL REFLÜDE RENAL SKAR
OLUŞUMUNDA OKSİDATİF STRESİN ROLÜ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. SEÇİL KÖSE

KAYSERİ – 2010



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**PRİMER VEZİKOÜRETERAL REFLÜDE RENAL SKAR
OLUŞUMUNDA OKSİDATİF STRESİN ROLÜ**

Dr. SEÇİL KÖSE

Danışman

Prof. Dr. RUHAN DÜŞÜNSEL

KAYSERİ-2010

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	I
TABLolar LİSTESİ	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Vezikoüreteral reflü	3
2.2. Reflü nefropatisi	9
2.3. Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif stres.....	15
2.4. Oksidatif stres ilişkili renal hasar.....	23
3. HASTALAR ve YÖNTEM.....	28
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR	50
7. KAYNAKLAR	51
EK TABLOLAR	59
TEZ ONAY SAYFASI	63

KISALTMALAR

- AOPP** : İleri protein oksidasyon ürünleri
DES : Detrussör sfinkter dissinerjisi
DMAB : Dimetilenaminobenzaldehit
DMSA : Dimerkaptosüksinik asit
DTNB : 5,5'- di tiyobis-2-nitrobenzoik asit
DTPA : Dietilentriaminpentaasetik asit
GSH : Redükte glutatyon
GSH-Px : Glutatyon peroksidaz
HMW : Yüksek moleküler ağırlıklı
H₂O₂ : Hidrojen peroksit
HOCl : Hipoklorik asit
IRR : İntrarenal reflü
İYE : İdrar yolu enfeksiyonu
KI : Potasyum iyodür
LDL : Düşük dansiteli lipoprotein
LDL-ox : Okside düşük dansiteli lipoprotein
LMW : Düşük moleküler ağırlıklı
MDA : Malondialdehit
MPO : Miyeloperoksidaz
NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
OD : Ortalama dağılım
O₂[·] : Süperoksit radikali
OH[·] : Hidroksil radikali
OLAARP : Okside lipit/amino asit reaksiyon ürünü
PBS : Fosfat tamponlu salin
Pnl : Pirol norlösün
RN : Reflü nefropatisi
RNC : Radyonüklid sistoüretrografi

SDBH : Son dönem böbrek hastalığı
SOR : Serbest oksijen radikalleri
TCA : Trikloroasetik asit
TCEP : Tris (carboksietil) fosfin
TNB : Tiyobis-2-nitrobenzoik asit
VSUG : İşeme sistoüretrografi
VUR : Vezikoüreteral reflü
XO : Ksilenol oranj
ΔOD : Ortalama dağılım farkı

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Vezikoüreteral reflü nedenleri	5
Tablo 2. Vezikoüreteral reflüde cerrahi tedavi endikasyonları.....	9
Tablo 3. Hasta ve kontrol gruplarının MPO, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol değerlerinin karşılaştırılması.....	37
Tablo 4. Skarlı ve Skarsız hasta gruplarının MPO, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol değerlerinin karşılaştırılması.....	37
Tablo 5. Hafif, Orta ve Ağır reflülü hastaların MPO, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol değerlerinin karşılaştırılması.....	38
Tablo 6. Tek taraflı ya da çift taraflı reflüsü olan hastaların MPO, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol değerlerinin karşılaştırılması....	39
Ek Tablo 1. Hasta grubunun demografik özellikleri.....	59
Ek Tablo 2. Hasta grubunun MPO, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol düzeyleri	60
Ek Tablo 3. Kontrol grubunun demografik özellikleri	61
Ek Tablo 4. Kontrol grubunun MPO, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol düzeyleri	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Normal ve reflü olan üreterovezikal bileşkeler.....	4
Şekil 2.	Vezikoüreteral reflünün uluslararası sınıflaması.....	6
Şekil 3.	İntrarenal reflüde papiller konfigürasyon.....	12
Şekil 4.	Akut pyelonefrit patogenezindeki olaylar zincirinin hipotezi.....	13
Şekil 5.	Oksidatif stresin tanımı.....	16
Şekil 6.	Metal-katalize Haber-Weiss reaksiyonu.....	17
Şekil 7.	Aktive fagositlerden oksidanların üretimi.....	18
Şekil 8.	Miyeloperoksidaz ile H_2O_2 in metabolizması.....	19
Şekil 9.	Serbest oksijen radikallerinin antioksidan enzimlerle nötralizasyonu.....	20
Şekil 10.	Oksidatif stresle oluşan tübülointerstisyel hasar.....	25
Şekil 11.	Oksidatif stresle ilişkili tübülointerstisyel hasarda üreteral obstruksiyon ve kalsiyum oksalatın rolü.....	26

ÖZET

Amaç: Primer vezikoüreteral reflüde (VUR) renal skar oluşumunda oksidatif stresin rolünün araştırılmasıdır.

Hastalar ve yöntem: Bu çalışma Şubat 2009 – Şubat 2010 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Nefroloji Bilim Dalında prospektif olarak yapıldı. Çalışmaya primer VUR tanısı alan ve DMSA’da renal skar olan 32 hasta ile primer VUR tanısı olup DMSA’da renal skar olmayan 12 hasta olmak üzere toplam 44 hasta (11 erkek, 33 kız) alındı. Ayrıca 4’ü erkek, 14’ü kız 18 sağlıklı çocuk kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Ayrıca hastalar renal skar varlığına bakılmaksızın reflü derecesine göre GradeI-II(hafif), GradeIII(orta), GradeIV-V(ağır) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Hastaların tanıları ve renal skar varlığı, voiding sistoüretrografi(VSUG) ve DMSA ile konuldu. Hastalardan tanı esnasında ve idrar kültürü steril olduğunda kan örnekleri alındı. Serum/plazma örneklerinde, miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ile lipit hidroperoksit, pirrolize protein, ileri protein oksidasyon ürünleri (AOPP) ve tiyol düzeyleri çalışıldı.

Bulgular: Hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında MPO aktivitesi, lipit hidroperoksit, pirrolize protein ve AOPP seviyeleri hasta grubunda istatistiksel

olarak yüksek belirlendi ($p<0.05$). Tiyol seviyeleri kontrol grubuna göre düşük bulunmasına karşın 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p>0.05$). Skarlı ve skarsız hastalar MPO aktivitesi ile AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). Skarsız ve skarlı grubun MPO aktivitesi, AOPP, lipid hidroperoksit ve pirrolize protein düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$). Hafif, orta ve ağır reflü dereceli hasta grupları kendi aralarında MPO aktivitesi, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$). Her 3 grubun MPO aktivitesi, AOPP, lipid hidroperoksit ve pirrolize protein düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$).

Sonuç: Primer VUR'da artmış oksidatif stres belirteçlerinin renal skar ve VUR'un derecesinden bağımsız olarak VUR'la ilişkili olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: oksidatif stres, primer vezikoüreteral reflü, renal skar

THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN RENAL SCAR FORMATION DUE TO PRIMARY VESICOURETERAL REFLUX

Aim: The purpose of this study was to evaluate the role of oxidative stress in renal scar formation due to primary vesicoureteral reflux (VUR).

Patients and methods: The study was performed prospectively between February , 2009- February, 2010, at the Erciyes University, Faculty of Medicine, Department of Pediatric Nephrology. The study consisted of 44 patients (11 boys, 33 girls) who were diagnosed as primary VUR [32 renal scar (+) and 12 renal scar (-) with DMSA]. Eighteen healthy subjects (4 boys, 14 girls) appropriate with age, were included as controls in the study. The patients were divided into 3 groups according to the reflux grade in VCUG as grade I-II (mild), grade III (moderate) and grade IV-V(severe). During the study all patients were sterile for urine analysis. Blood samples were taken at the admission and myeloperoxidase (MPO) activity, advanced oxidation protein products (AOPP), lipid hydroperoxides, pyrrolized proteins and thiol levels were measured from the plasma and serum samples.

Results: MPO activity, AOPP, pyrrolized proteins and lipid hydroperoxides levels were significantly higher in VUR group than control group ($p<0.05$) and there was no significant difference between thiol levels ($p>0.05$). There was no significant

difference between MPO activity, AOPP, pyrrolized proteins, lipid hydroperoxides and thiol levels in both scar (+) and scar (-) groups ($p>0.05$). MPO activity, AOPP, pyrrolized proteins and lipid hydroperoxides levels were significantly higher in scar (+) and scar (-) group when compared with control group ($p<0.05$). There was no significant difference between MPO activity, AOPP, pyrrolized proteins, lipid hydroperoxides and thiol levels in mild, moderate and severe reflux groups ($p>0.05$). MPO activity, AOPP, pyrrolized proteins and lipid hydroperoxides levels were significantly higher in all reflux groups when compared with control group ($p<0.05$).

Conclusion: High levels of oxidative stress markers in patients with VUR were found to be related to VUR, independently from renal scar and reflux grade.

Key words: oxidative stress, primary vesicoureteral reflux, renal scar

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Vezikoüreteral reflü (VUR), idrarın mesaneden üst üriner sisteme anormal geri kaçıdır. VUR insidansının çocukluk çağında %1 kadar yüksek olduğu bilinmektedir (1-4).

Vezikoüreteral reflünün büyük bir kısmı spontan olarak düzelirken, bazı hastalarda reflü nefropatisi (RN) gelişmekte ve RN son dönem böbrek hastalığına (SDBH) ilerleyebilmektedir (5). Üriner sistem patolojilerine yaklaşımda amaç böbreği korumaktır. Bu nedenle erken tanı ve tedavi yaklaşımı ile çocuk böbreğinin en iyi şekilde korunması amaçlanır.

Vezikoüreteral reflüye bağlı böbrek parankim hasarının etiyopatogenezi tartışmalıdır. Çalışmalarda enfeksiyon olmadan da renal skar geliştiği gösterilmiş, steril reflünün oluşturduğu renal hasarın immün yanıtla ilişkili olabileceği de ileri sürülmüştür (1).

Böbrek dokusunda hasar oluşturarak skar gelişimine neden olan iki temel olay; iskemi reperfüzyon hasarı ve fagositoz sırasında degranulasyon ile açığa çıkan serbest oksijen radikalleri (SOR) ile birlikte lizozomal enzimlerin yıkıcı etkisidir (6).

Serbest oksijen radikallerinin aşırı miktarda üretildiği ve/veya antioksidan mekanizmaların yetersiz kaldığı durumlarda oksidan-antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres varlığı, nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi temel hücre komponentlerinin oksidanlarla etkileşimi sonucu oluşan toksik bileşiklerinin birikimiyle sonuçlanmaktadır (7).

İleri protein oksidasyon ürünleri (AOPP), miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, lipit hidroperoksit, pirrolize proteinler oksidatif stres durumunda organizmada serum ya da plazma düzeylerinin arttığı saptanmış olan belirteçlerdendir. Serbest tiyol grupları ise antioksidan sistem içinde bulunurlar ve oksidatif stres durumunda plazma düzeylerinin azaldığı saptanmıştır.

Literatürde böbrek patolojilerinin oluşumunda oksidatif stresin rolünü ortaya koyan çok sayıda çalışma olsa da, VUR'da oluşan böbrek hasarının patogeneğinde oksidatif stresin rolü tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmada, VUR tanısı alan çocuk hastaların plazma MPO aktivitesi, AOPP, lipit hidroperoksit, serbest tiyol ve serum pirrolize protein düzeylerinin belirlenmesi ve renal skar etiyopatogeneğinde oksidatif stresin rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. VEZİKOÜRETERAL REFLÜ

2.1.1. Tanım

Vezikoüreteral reflü, idrarın mesaneden üreterlere doğru geri kaçmasıdır. Normalde üreterler mesaneye oblik yönde girerler ve detrüssör kasları lateral bölgeden delerek mesane mukozası ile detrüssör kasları arasında flap-valf mekanizması oluşturarak reflü oluşmasını önler. Mukoza ve detrussör kasları arasındaki bu submukozal tünelin kısalığı ya da olmadığı durumlarda reflü oluşmaktadır (1-3).

2.1.2. Epidemiyoloji

Sağlıklı bireylerde VUR sıklığı bilinmemekle birlikte çocukların %1'inde VUR bulunmaktadır (1,8).

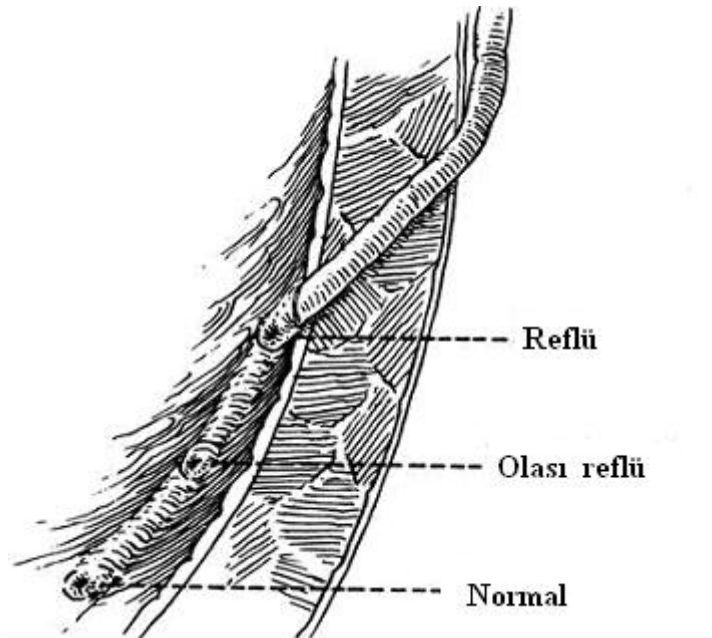
Vezikoüreteral reflü tanısı alan hastaların çoğu geçirilmiş idrar yolu enfeksiyonu (İYE) araştırılırken tespit edildiği için, bu hasta grubunda VUR insidansı daha

yüksek tespit edilmektedir. İYE olan hastaların yaklaşık olarak 1/3'ünde ve prenatal hidronefroz tanısı alanların %9-20'sinde VUR mevcuttur (4). İYE sonrası incelenen, çoğunluğu beyaz kızlardan oluşan grupta %29 ila %50 oranlarında reflü tespit edilmiştir. VUR oluşma sıklığı İYE'nin şiddeti ile doğru, hastanın yaşı ile ters orantılıdır. Kız çocuklarında daha fazla görülmektedir (1,2).

Son yıllarda VUR'da genetik geçiş üzerinde durulmaktadır. VUR'un otozomal-dominant kalıtım ile geçtiği düşünülmektedir. Birçok araştırmada, kardeşler arasındaki bağlantı açık şekilde gösterilmiştir. VUR'u olan indeks hastanın kardeşlerinin %27-33'ünde VUR saptanmıştır (9,10). Benzer şekilde ebeveynlerinde reflü olan çocuklarda VUR insidansı yüksek tespit edilmiştir (8,11).

2.1.3. Sınıflama

Veziköüreteral reflü primer ve sekonder olarak oluşabilir. Primer VUR konjenitaldir ve altta yatan herhangi bir nöromüsküler veya obstruktif bir olay ile ilişkili değildir. Anti-reflü mekanizması flap-valf mekanizmasının bir sonucudur (12).



Şekil 1. Normal ve reflü olan üreterovezikal bileşkeler (1)

Üreterin submukozal kısmı mesanenin kas yapısına bitişiktir ve mesane boşalırken çöker. İşeme sırasında yerine oturmasında intravezikal basınç rol oynar. Reflü bulunan üreterin orifisi, üreterin mesane içi kısmının kısalması ile sonuçlanacak şekilde mesanede daha lateral ve daha kraniyal yerleşimli olma eğilimindedir (Şekil 1) . Bu uzunluk genetik olarak belirleniyor olabilir. Bir dizi spesifik üroepitelyal gen ve genetik polimorfizm ile primer VUR arasında nedensel bir ilişki vardır (1,2,8,13).

Tablo 1: Vezikoüreteral reflü nedenleri (2)

Reflü tipi	Nedenler
Primer	1- Valf mekanizmasının konjenital yetmezliği 2- Üreterovezikal bileşke anomalileri ile beraber - Üreteral duplikasyon - Üreterosel - Üreteral ektopi - Paraüreteral divertikül
Sekonder	1- Mesane içi basınç artışına sekonder - Nörojenik mesane - Nörojenik olmayan mesane disfonksiyonu - Mesane çıkış yolu obstruksiyonu - Posterior üretral valf 2- İnflamasyona sekonder - Ciddi bakteriyel sistit - Yabancı cisim - Mesane taşı 3- Üreterovezikal bileşke operasyonlarına sekonder

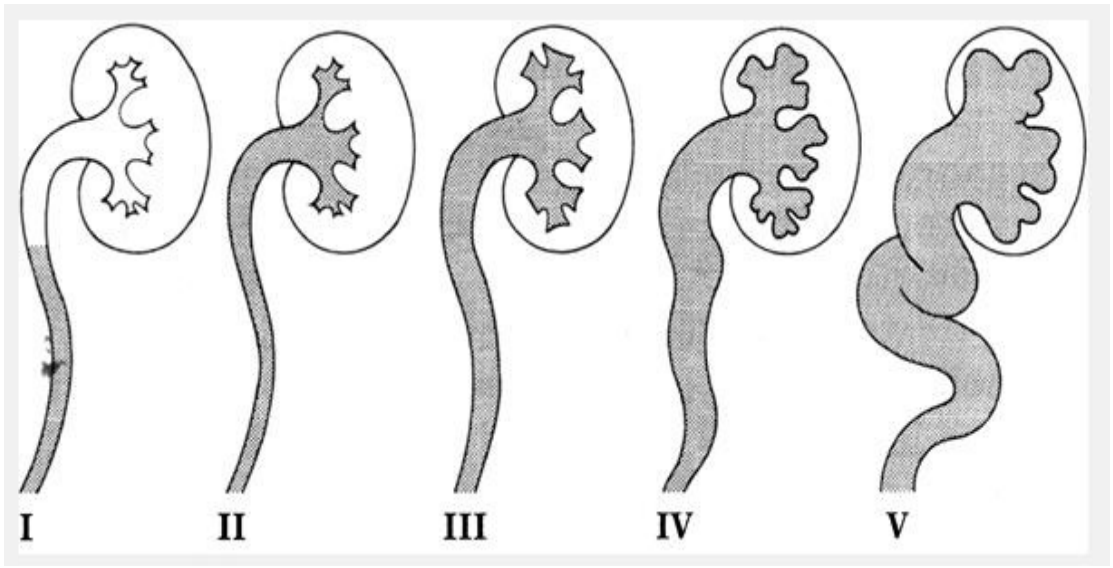
Sekonder reflü patolojik mesane dinamiklerinin bir sonucudur. Üretral obstruksiyon, nöromuskuler hastalık veya anormal işeme kalıpları, üreterovezikal bileşkenin kendisinde bir anormalliğin bulunmadığı hastalarda, VUR'un altta yatan nedeni olabilir (1,2).

Primer ve sekonder VUR nedenleri tablo 1'de verilmiştir.

2.1.4. Derecelendirme

Vezikoüreteral reflünün derecelendirmesi işeme sistoüretrografi (VSUG) ile elde edilen görüntülere göre I-V arasında yapılmaktadır. Uluslararası Reflü Çalışma Grubu [International Reflux Study (IRS)] tarafından derecelendirme standardizasyonu yapılmıştır (14). I. dereceden reflüde idrar sadece üreterlere dolarken, II. dereceden reflüde idrar dilatasyon olmaksızın üreter ve toplayıcı sisteme

ulaşır. Bunlar sıklıkla hafif reflü olarak adlandırılır. III. derece veya orta şiddette reflüler forniks aıların keskin şeklinin kaybolması ile birlikte kalikslerde hafif düzleşmeye neden olur. IV derece reflülerde kalikslerin %50'den fazlası forniks açıları gözlenemeyecek şekilde düzleşmiştir. V. dereceden reflü tüm kalikslerin düzleşmesi ve papilla görünümünün kaybolması olarak tanımlanır (şekil 2). Her bir derecede üreter dilatasyonu daha şiddetli hale gelir; IV ve V. dereceden reflüler sıklıkla şiddetli veya yüksek dereceli reflü olarak adlandırılır. Aynı zamanda üreter kıvrımlı hale gelmiştir (1,2,14).



şekil 2. Veziköüreteral reflünün uluslararası sınıflaması. Grade I-V reflünün şematik gösterilmesi (1) (grade I: reflü üreterde sınırlı, renal pelvise ulaşmamış, dilatasyon yok. Grade II: reflü renal pelvise ulaşmış, dilatasyon yok. Grade III: reflü renal pelvise ulaşmış, dilatasyon gelişmiş fakat forniksler normal yapılarını korumaktadır. Grade IV: forniksler küntleşmiş ve ciddi dilatasyon var. Grade V: hidronefroz var ve üreterler kıvrılmıştır.)

2.1.5. Klinik

Reflü tanısı genelde İYE incelenirken konulmaktadır. VUR tanısı konulduğunda ortalama yaş 2–3 yıl olup, olguların %80'i kızdır. VUR tanısı daha nadir olarak işeme disfonksiyonu, böbrek yetmezliği, hipertansiyon ve diğer üriner sistem anomalileri araştırılırken konulmaktadır. VUR'un tipik klinik bulgusu bulunmamaktadır (2).

2.1.6. Tanı

Vezikoüreteral reflü tanısı esas olarak radyolojik incelemelerle konulmaktadır.

Üriner sistem ultrasonografisi

İyonizan radyasyon içermeyen, invaziv olmayan bir tekniktir. Böbrekler ve mesanenin incelenmesinde, pelvis ve kaliks dilatasyonunun değerlendirilmesinde primer görüntüleme yöntemi olarak yaygın kabul görmüştür. Ancak üretra ve üreter anatomisi ile ilgili sağladığı bilgiler zayıf kalmaktadır (1, 15,16).

İşeme sistoüreterografisi

Vezikoüreteral reflü tanısındaki geleneksel metod işeme sistoüreterografisidir. Vücut ısıya kadar ısıtılan kontrast maddenin ince bir kateter yardımı ile 70-100cmH₂O basıncında infüzyon tarzında yavaş yavaş verilmesi şeklinde yapılan bir işlemdir. Mesaneyi doldururken ya da işeme esnasında VUR tespit edilir. VSUG mesane ve üretra dahil ince anatomik ayrıntılar ile ilgili görüntüler sağlar. VSUG'nin en önemli kısıtlaması, özellikle gonadların radyasyona maruz kalmasıdır (1,15,16).

Radyonüklid sistoüreterografi

İki yöntem vardır. Direkt radyonüklid sistoüreterografi (RNC) mesane kateterizasyonu ve radyonüklidin doldurulmasını gerektirir. İndirekt RNC mesaneye kateter uygulanmasını gerektirmez, ancak sadece tuvalet eğitimi almış çocuklarda dinamik renografiyi takiben İV Tc-99m MAG3 veya dietilentriaminpentaasetik asit (DTPA) enjeksiyonundan sonra uygulanabilir. RNC'de gonadlar daha az radyasyona maruz kalır, ancak anatomik detaylar iyi değildir (1,15,16).

İşeme ürosonografisi

Mikro kabarcık içeren kontrast madde kullanılarak yapılan kontrastlı işeme ürosonografisi, özellikle de dilatasyon oluşturan VUR'da VSUG ile karşılaştırılabilir tanısal doğruluğa sahiptir. Üreter ve üretra ile ilgili iyi anatomik bilgi sağlamaz (1,15,16).

^{99m}Tc-DTPA (dietilentriaminpentaasetik asit) ile sintigrafi

^{99m}Tc-DTPA tübüler rezorpsiyon veya anlamlı bağlanma olmadan glomerüler filtrasyonla ekskrete edilirler. Böbrek parankiminin fonksiyonu hakkında bilgi verir. Obstruksiyonu tespit etmede kullanılan en önemli yöntemdir (1,15,16).

^{99m}Tc-DMSA (dimerkaptosüksinik asit) ile sintigrafi

^{99m}Tc-DMSA glomerüller tarafından filtre edilir ve böbrek tübül hücrelerine yüksek oranda bağlanır. Böbrek parankimini ve skar oluşumunu en iyi gösteren radyolojik yöntemdir (1,15,16).

2.1.7. Tedavi

Tıbbi tedavi:

Veziköüreteral reflünün tıbbi tedavisinde üç önemli nokta mevcuttur. Birincisi; spontan gerilediği bilinen bu hastalıkta uygulanan profilaktif antibiyotik tedavisinin izlem süresince oluşabilecek İYE ataklarını engellediğidir. İkinci olarak, antibiyotik profilaksisine rağmen spontan düzelmeyen yüksek dereceli reflülerde cerrahi tedaviler gündeme gelmektedir. Ancak, profilaksinin cerrahi için geçen sürede böbreği kalıcı hasarlardan koruduğu bilinmektedir. Üçüncü olarak da, VUR fizyopatolojisindeki rolü kanıtlanmış detrüssör sfinkter dissinerjisinin (DES) tedavisidir. Bu nedenlerden dolayı, 1 yaş altındaki çocuklarda VUR derecesi ne olursa olsun antibiyotik profilaksisi önerilmektedir (17,18).

Detrüssör sfinkter dissinerjisinin başlangıç tedavisi davranışsal tedaviler ve üroterapidir. Öncelikle çocuğa ve ailesine işeme mekaniği ve problemin kaynağı ile ilgili bilgiler verilmelidir. İşeme sırasında doğru oturma ve pelvik tabanın gevşetilmesine yönelik eğitimler verilmelidir. Aşırı aktif mesane semptomları olan hastalarda anti-kolinerjik tedavi başlanması gerekir. Bununla birlikte, dirençli olgularda ise alfa blokerler alternatif tedavilerdendir (17-19).

Cerrahi tedavi:

Veziköüreteral reflü tedavisinde uygulanan cerrahi prosedürler, endoskopik cerrahi, açık cerrahi laparoskopik cerrahi olmak üzere üç şekildedir (18). VUR'da cerrahi tedavi endikasyonları Tablo 2'de özetlenmiştir (19).

Tablo 2. Vezikoüreteral reflüde cerrahi tedavi endikasyonları (19).

Renal Skar (-)	Renal Skar (+)
-Grade V, tek taraflı veya bilateral, 6-10 yaş - Grade V, bilateral, 1-5 yaş - Grade III-IV, bilateral, 6-10 yaş -Kalıcı grade III-IV, tek taraflı veya bilateral, >1 yaş -Profilaksiye alternatif olarak, grade V tek taraflı 1-5 yaş	- Grade III-IV, bilateral, 6-10 yaş - Grade V, tek taraflı veya bilateral, >1 yaş -Kalıcı grade III-IV, tek taraflı veya bilateral, >1 yaş - Grade III-IV, bilateral, 1-5 yaş - Grade V, tek taraflı veya bilateral, <1 yaş

2.2. REFLÜ NEFROPATİSİ

Vezikoüreteral reflü olan hastaların bazısında reflü nefropatisi (RN), RN olan hastaların bazısında da kronik böbrek hastalığı gelişmekte ve bunların da küçük bir bölümü son dönem böbrek hastalığına (SDBH) ilerlemektedir.

Reflü nefropatisi patolojik bir tanımlama olup zamanla intravenöz pyelografi, DMSA ve ultrasonografi gibi görüntüleme metodları ile böbrekte görülen lezyonları tarif etmek için kullanılmaktadır (20). İlk defa 1970’lerde bu terim kullanılmaya başlanmıştır. Renal skar, renal lezyon, renal parankimal anormallikler, displazi terimleri RN ile sinonim isimlendirmelerdir (13).

Reflü nefropatisinin, 30-40 yıl öncesine kadar reflünün meydana getirdiği renal skar ile karakterize olduğu belirtilmesine rağmen bunun mekanizması halen tam olarak anlaşılamamıştır. Bu, öncelikle interstisyel dokunun kronik inflamatuvar hücreler ile infiltre edildiği, daha geç dönemde ise fibroblastların ve kollajenin yerleştiği, tübülointerstisyel bir hastalıktır. Tübülointerstisyel inflamasyonun şiddeti ve fibrozisin boyutu, kronik nefropatilerin uzun dönemli etkileri ve progresyonu hakkında belirleyici rol oynarlar. Fibroblastlar, renal interstisyel fibrozisin gelişimi için büyüme faktörlerinin ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentezlenmesi ve salınımında en etkili olan hücrelerdir (21,22).

Böbrek skarları, sıklıkla kronik atrofik piyelonefrit olarak da adlandırılan ve parankimde odaksal ve yaygın hasar ile birlikte olan bir dizi radyolojik anormalliği tanımlamaktadır. Kronik piyelonefrit terimi aslında yanlış bir terminolojidir, çünkü böbrek skarı genellikle uzun süreli böbrek enfeksiyonu ile bağlantılı değildir. 1973 yılında, Bailey RN yerine kronik atrofik piyelonefrit teriminin kullanılmasını önermiştir (23). Bu terimin kabul edilmesi obstruksiyon olmadığı durumlarda VUR'un böbrekte skar oluşumunun ön şartı olduğu konusundaki fikir birliğinin altını çizmiştir. Böbrek skarlarının oluşumunda VUR ile enfeksiyon birlikteliğinin kritik rolü ilk olarak cerrahi olarak VUR oluşturulan domuz yavrularında gösterilmiştir. Yeni klinik çalışmalar piyelonefrit sonrası böbrek skarlarının, gösterilebilir reflü olmaksızın da, gelişebileceğini bildirmektedir (24).

2.2.1. Böbrek Skarı Oluşumunun Patogenezi

Skar, vücut dokularındaki hasarın iyileşmesini sağlayan normal bir durumdur. Skar formasyonu 3 adımda oluşur: lökositler tarafından infiltrasyon, kalıcı hücrelerin proliferasyonu ve yeni oluşan ekstrasellüler matriksin artışı ve birikmesi. Böbrekteki fibrogenesis bunlara benzer farklı fazları gerektirmektedir. Tübüler epitel hücrelerin aktivasyonu ile görülen inflamatuvar faz ve ardından aktive fibroblastların artışıyla karakterize bir periyod gelmektedir. Bu fibroblastlar, büyük oranda ekstrasellüler matriks bileşenlerinin oluşmasına yol açarlar. Bu döneme kadar yara iyileşmesine benzer şekilde geri dönüşümlüdür. Skar sürecinin son dönemi, glomerüller ve tübüler hücrelerin progresif azalmasıyla karakterizedir. Sonuçta bu glomerüller işlevsizliğe ve tübüler atrofiye neden olur. SDBH'da renal hücrelerin yerini fibröz doku alır ve bu durumda glomerül ve interstisyumda sklerotik değişikliklere katkıda bulunmaktadır (25,26).

Son çalışmalarda tübül epitel hücrelerin renal skar oluşumunda önemli bir rol üstlendiği gösterilmiştir. Bazı patolojik durumlarda renal tübüler epitel hücreleri, epitelyal-mezenkimal hücre dönüşümü gösterebilmektedir ve sonuçta da matriks üreten fibroblastlar oluşur. Bu transformasyon kronik renal hastalıklarda renal fibrozise sebep olur ve fibrotik böbreklerde interstisyel fibroblastların büyük bir oranı tübüler epitelyal hücrelerden orijin almaktadır (27).

Böbrekte skar oluşumu hem doğuştan veya embriyolojik ve hem de edinilmiş veya doğum sonrası böbrek bozuklukları için kullanılan bir terimdir. Reflü ile ilişkili böbrek patolojileri üç yolla açıklanmıştır:

2.2.1.1. Embriyolojik Displazi

Mackie ve Stephens (28) renal displazi veya hipoplazinin embriyonik üreter tomurcuğunun gelişimsel anormalliğinden kaynaklandığını öne sürmüştür. Anormal olarak, Wolfian kanalının daha kaudal ucundan çıkan üreter tomurcuğu trigonda daha lateral yerleşimli ektopik orifis ile ilişkilidir. Sonuç olarak, kısa veya hiç olmayan intramural tünel reflü yapan üreter ile sonuçlanır. Bu arada, anormal olarak çıkan üreter tomurcuğu normal, santral blastomayı penetre edemez ve bu durum hipoplastik veya displastik böbrek ile sonuçlanır. İlk olarak dubleks böbreklerdeki anormallikleri açıklamak için öne sürülen bu teori daha sonra reflü bulunan tek sistemli böbrekleri de içine alacak şekilde genişletilmiştir (29). Bu teori, şiddetli reflü veya ektopik üreterler ile birlikte duplikasyon bozukluğu bulunan seçilmiş olgularda böbrek patolojilerini açıklamaktadır.

2.2.1.2. Steril Reflü

Hodson ve ark (30) domuzlarda mesane çıkış yoluna obstruksiyon yaparak yüksek basınçlı VUR oluşturmuşlar ve bu domuzlarda renal skar oluştuğunu göstermişlerdir. Steril reflü tarafından böbrek skarlarının, VSUG'de intrarenal reflü (İRR) (piyelotübüler veya böbrek pelvisinden toplayıcı tübüllere idrar geri akımı) olduğu gösterilen alanlara karşılık gelen alanlarda en yoğun olduğunu göstermişlerdir.

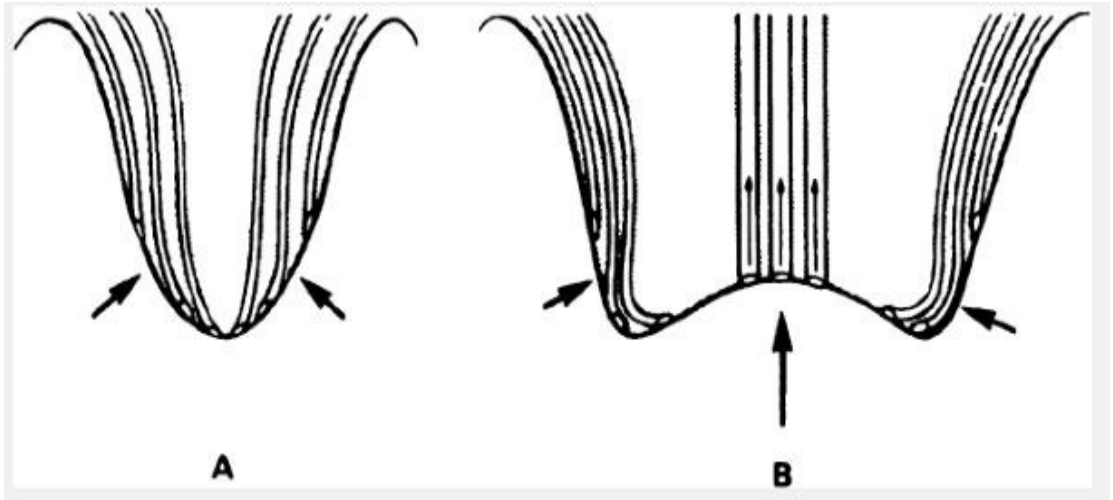
Yapılan çalışmalarda, domuzlarda ve insanlarda temel 2 papilla yapısı olduğu gösterilmiştir (1,31,32)(Şekil 3). Bunlar:

1-Konveks papilla ya da basit papilla

2-Konkav ya da düz papilla

Konveks papillalar; oluklu orifisler ile oblik olarak açıldığı konveks kaliks yüzeylerinin bulunduğu konik yapılardır. Bundan dolayı bu tip papilla yapısı İRR'nin

oluşmasına imkan vermez. Bunun aksine, konkav papillalar; büyük papillalarla birleşen ve papilla duktuslarının kalikse boşluklu orifisler ile açıldığı böbrek papillaları İRR'nin oluşmasına izin verir. Bu birleşik veya kombine papillalar çoğunlukla skarın daha sık görüldüğü polar bölgelerde bulunur. Diğer nedenler ile ölen çocuklarda gerçekleştirilen post-mortem çalışmalar insan böbreklerinin 2/3'ünde reflü potansiyeline sahip en az bir papilla olduğunu ortaya çıkarmıştır (31). Reflüye yol açmayan papillanın reflüye sebep olan papillaya dönüşümü enfekte idrar reflüsünden veya bitişik papilladaki skar oluşumundan kaynaklanır . Bu durum böbreğin büyük kısmını İRR'ye maruz bırakır. İYE tekrarlırsa, piyelonefrit ve ilerleyici böbrek skarı oluşma riskini artırır. Bunun aksine, reflü bulunmayan papillalar ile tamamen dolu olan böbrekler, İYE ve VUR olsa bile, böbrekte skar oluşumundan korunabilir (24).



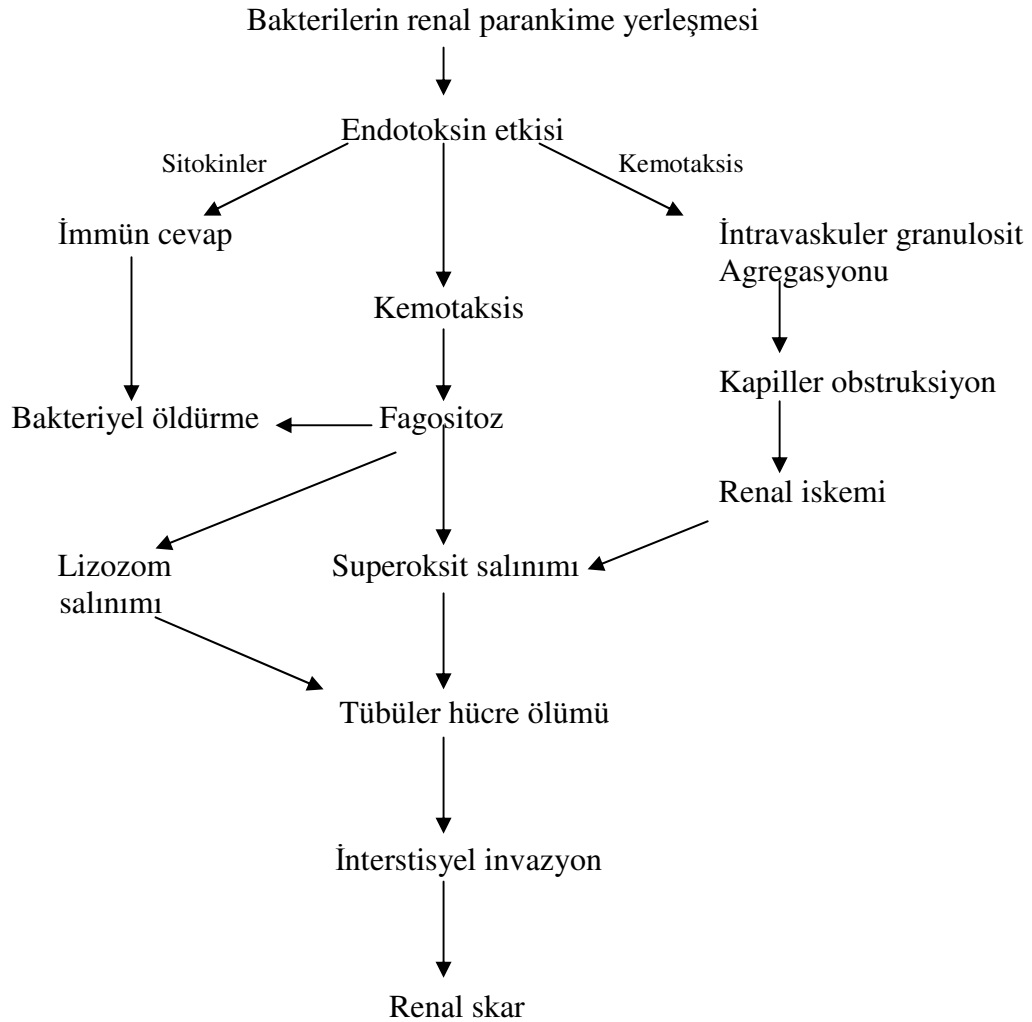
Şekil 3. İntrarenal reflüde papiller konfigürasyon. A: Konveks papilla (reflü olmayan papilla). B: Konkav yada düz papilla (reflü olan papilla) (1)

Çeşitli derecelerde mesane çıkış obstruksiyonu bulunan domuzlar ile yapılan çalışmalarda, Ransley ve ark (33) enfeksiyon olmaksızın böbrek skarının sadece uzun süreli mesane içi basınç varlığında oluşabileceğini göstermiştir. Bu değişiklikler, işeme sonrası büyük miktarda rezidüel idrar ile bağlantılı olarak işeme ve etkisiz mesane boşalması arasında istirahat basıncının yüksekliği olarak tanımlanan, detrüsör dekompanzasyonu ile ilişkilidir. Bu tip uzamış yüksek basınçlı reflü ile korelasyon gösteren klinik nadirdir ve primer olarak posterior üretral valfi

olan erkek çocuklar ve uyumsuz nöropatik mesanesi veya Hinman sendromu olan çocuklarda gözlenir (33).

2.2.1.3. Enfeksiyon

Yapılan deneysel çalışmalar, bakterinin eradikasyonundan sorumlu inflamatuvar yanıtın böbrek dokusundaki erken piyelonefritik hasardan ve takip eden böbrek skarlarından da sorumlu olduğunu bildirmiştir (13). Robert ve ark (34) primat modellerini kullanarak sonucunda böbrek skarına yol açan olayları birleştiren bir teori geliştirmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Akut piyelonefrit patogenezindeki olaylar zincirinin hipotezi (34)

Hem immün hem de inflamatuvar yanıtı başlatan olay böbrek parankiminin bakteri ile inokulasyonudur. İmmün yanıt canlı veya ısı ile ölmüş bakteriler ile ortaya çıkabilirken, akut inflamatuvar yanıt sadece canlı bakteri inokulasyonundan sonra

meydana gelir. Isı ile ölmüş bakterilerin inokulasyonu böbrekte skar oluşumuna neden olmadığı için akut inflamatuvar yanıt kalıcı böbrek hasarı gelişiminde kritik bir role sahip gibi görünmektedir (34).

Böbrek zedelenmesi ile sonuçlanan olaylar dizisini başlatan granülosit göçünü bakteri fagositozu takip eder. Granülositler bakteriyi öldürerek hem granülosit içinde hem de böbrek zedelenmesine yol açacak şekilde tübül lümeninde endotoksinlerin serbestleşmesine neden olur. Solunumsal patlama ile süperoksitleri ortaya çıkarır. Bu olay sadece bakteri için değil, aynı zamanda granülositler ve çevredeki böbrek tübül hücreleri için de toksik olan oksijen radikallerini meydana getirir (35). Tübül hücrelerinin ölümü toksik inflamatuvar ajanları interstisyuma yayarak daha ileri hasara neden olur. Damar içi granülosit agregasyonu ve ödemden kaynaklanan odaksal parankim iskemisi böbrek parankiminin bakteriyel enfeksiyonu ile meydana gelir. İskemik dokuda, adenosin monofosfatın anaerobik metabolizması sırasında hipoksantin üretilir. Reperfüzyon sırasında, ksantin oksidaz ve oksijen varlığında hipoksantin süperoksitler ve hidrojen peroksiti oluşturur (35,36). Piyelonefrite karşı gelişen akut inflamatuvar yanıt ile ilişkili interstisyel hasar, iskemi ile bağlantılı hasar ve toksik enzimlerden kaynaklanıyor gibi görünmektedir. Bu durum böbrekte skar oluşumuna yol açar.

2.2.2. Reflü nefropatisi komplikasyonları

Reflü nefropatisinin uzun dönemli komplikasyonları hipertansiyon, kronik böbrek yetmezliği ve son dönem böbrek hastalığıdır.

2.2.2.1. Hipertansiyon

Çocuk ve genç erişkinde hipertansiyonun en sık nedenlerinden biri RN'dir. Hipertansiyon renin-anjiyotensin sisteminin aktivasyonu sonucu gelişmektedir. Goonasekera ve ark (37) 15 yıllık takip sonunda 15-30 yaş arasında olguların % 18'inde hipertansiyon geliştiğini gözlemişlerdir. Hipertansiyon yaş, parankimal hasarın derecesi, hasarın tek ya da bilateral olması ve takip süresine göre çeşitli çalışmalarda değişik oranlarda saptanmaktadır (20). VUR ve renal skar olan çocukların retrospektif incelemelerinde hipertansiyon %15-20 oranında gözükmektedir.

Hastaların takip süresi arttıkça hipertansiyon sıklığı artmaktadır. Jacopson ve ark (38) 27 yıllık izlemlerinde RN'e ikincil piyelonefritik skarlı hastalarda hipertansiyon oranını %23 olarak bulmuşlardır. Kohler ve ark (39) bilateral renal skar olan olguların %58'inde, tek taraflı renal skar varlığında ise %33 oranında hipertansiyon saptamışlardır. Skar gelişen hastalarda VUR düzeltilse bile hipertansiyon riski değişmemektedir. Bu sebeple VUR olan hastalar ömür boyu en az yılda bir kez kan basıncı ölçümü yaptırmalıdır.

2.2.2.2. Böbrek Yetmezliği ve Son Dönem Böbrek Hastalığı

Vezikoüreteral reflüde SDBH gelişmesiyle ilgili mekanizmalar oldukça karmaşıktır (5). Hayvanlarda büyüyen böbrek üzerinde idrar akımı tıkanığında birtakım anormallikler oluşmaktadır; 1) glomeruler maturasyonun durması 2) glomerulosklerozis 3) bir takım tübüler hücrelerde iskemi ve nekrozis 4) diğer tübüler ve bağ dokusu hücrelerinde apoptozis 5) interstisyel inflamasyon, proliferasyon ve fibrozis ve 6) tübüler dilatasyon ve atrofi. Ek olarak, reflünün olduğu birleşik papillalarda skar oluşumu hem insanlarda hem hayvanlarda kanıtlanmıştır (5).

Reflü nefropatisi, SDBH'nın önemli bir sebebi olarak tanımlanmıştır. Kuzey Amerika pediatrik popülasyonda, RN'nin diyaliz ve transplantasyona yol açan 4. sebep olduğu rapor edilmiştir (40). 20 yıl önce İngiltere'de SDBH'ların %22'sinden RN sorumlu iken (41); 2006 yılında transplant (%5.2) ve diyaliz hastalarında (%3.5) 4. sık neden olduğu gösterilmiştir (40). İtalyan pediatrik böbrek yetmezliği derneği SDBH'sı olan hastaların %25'inde VUR hikayesi olduğunu bildirmiştir (42).

2.3. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ ve OKSİDATİF STRES

Elektronlar orbit adı verilen yörüngelerde hareket ederler. Her orbitte daima 2 elektron bulunur ve bunlar normalde ters yönde hareket ederler. En dış orbitalinde çiftleşmemiş elektron bulunan atom ya da moleküllere serbest radikal denir. Serbest radikaller kararsız yapılardır ve tek elektronlarını çiftlemek üzere amino asitler, proteinler, serbest yağ asitleri, lipitler, karbohidratlar ve nükleotidler gibi tüm hücre bileşenleriyle etkileşebilirler. Biyolojik sistemlerde en çok bulunan radikaller, iki

tane eşleşmemiş elektrona sahip olan moleküler oksijen (O_2) ve triplet oksijen (3O_2)'dir (7,43,44).

Oksidatif stres, serbest oksijen radikallerinin (SOR) üretimi ve antioksidan koruma mekanizmaları arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkan doku hasarı olarak tanımlanır (43,44)(Şekil5).

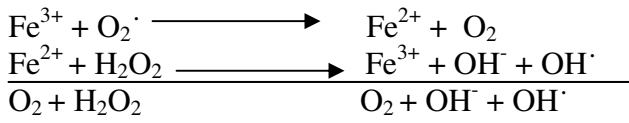


Şekil 5. Oksidatif stresin tanımı. (44)

Normal fizyolojik şartlarda, aerobik organizmalarda oksijen metabolizması sonucunda tehlikeli ve oldukça reaktif bileşenler olan SOR'un üretimi meydana gelmektedir. Oksidanların fizyolojik düzeyleri endojen ve ekzojen antioksidan koruyucu mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Artmış SOR düzeyi ve/veya azalmış antioksidan aktivitesi oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır ve bu birçok hastalığın patogenezinde örneğin tümör gelişimi, viral ekspresyon (HIV,AIDS), nörolojik hastalıklar (Alzheimer, Parkinson), diabetes mellitus, ateroskleroz, hipertansiyon ve kronik böbrek yetmezliğinde yer almaktadır (7,43,45).

İntrasellüler SOR üretimi, başlıca mitokondri olmak üzere, endoplazmik retikulum ve çekirdek membranında bulunan elektron taşıyıcı sistemler, peroksizomlar, plazma membranı ve sitoplazmada gerçekleşmektedir. Mitokondrilerdeki elektron transport zinciri moleküler oksijenin, tek elektron geçişiyle suya redüklenmesi, çeşitli radikallerin oluşumuyla sonuçlanır. Moleküler oksijen, tek elektron kazandığında $O_2^{\cdot-}$ radikallerine dönüşmekte, bu radikalın dismutasyonu ile hidrojen peroksit (H_2O_2)

oluşmakta ve H_2O_2 'nin daha ileri redüksiyonu, hidroksil radikalının ($HO^\cdot$) oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Hücrelerde üretilen $O_2^\cdot$, H_2O_2 ve nitroz oksit ($NO^\cdot$) gibi radikaller, daha ileri etkileşimlerle son derece reaktif ve çok daha toksik oksidanlar da oluşturabilmektedir. Örneğin: $O_2^\cdot$ ve H_2O_2 'den Fe/Cu gibi metallerin varlığında, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla (Şekil 6) $HO^\cdot$ oluşumu; $O_2^\cdot$ ve $NO^\cdot$ 'dan peroksinitrit oluşumu; $O_2^\cdot$ ve H_2O_2 'den Cl^- varlığında hipoklorik asit ($HOCl$) oluşumu gibi. Ayrıca, aktif hidroksil radikalleri, etkileştiği biyomoleküllerden peroksi, alkoksi ve alkil peroksi gibi daha az reaktif yeni radikaller de oluşturabilmektedir (7,46).



Şekil 6. Metal-katalize Haber-Weiss reaksiyonu(46)

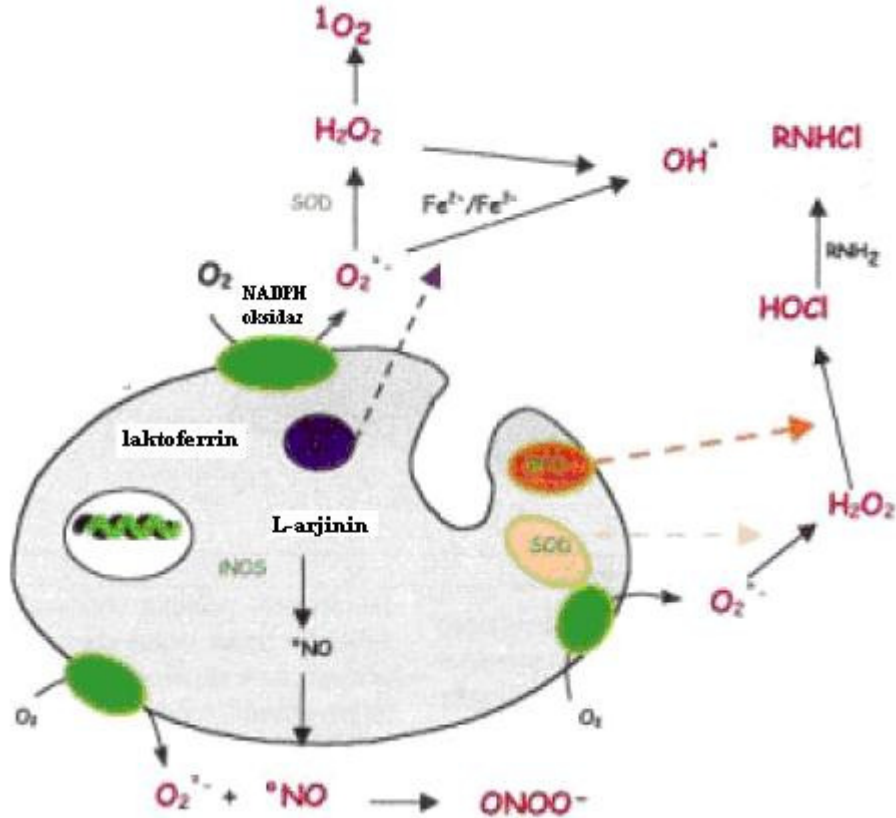
2.3.1 Fagositer Oksidan Üretici Sistemler

NADPH-Oksidaz Kompleksi Tarafından SOR Oluşturulması

Uygun uyarana maruz kalınmasını takiben hem polimorfonükleer nötrofiller hem de monosit-makrofajlar SOR üretimine neden olan ve “solunum patlaması” (respiratory burst) olarak adlandırılan bir sürece girerler (Şekil 7). Moleküler düzeyde bu olay, istirahat halindeki fagositlerde uyumakta olan ve aktivasyonu takiben Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) karşılığında moleküler oksijenin süperoksit anyonuna tek elektronluk indirgenmesini katalizleyen NADPH-oksidad kompleksinden ve elektron transfer sisteminden oluşur. NADPH-oksidad hem sitozol hem de plazma membranında bulunan birden çok protein bileşenini içerir. Aktivasyon ile birlikte, P47PHOX, p67PHOX ve p40PHOX bileşenlerinden oluşan sitozolik kompleks aktif NADPH-oksidadı tamamlamak için membrana bağlı sitokrom b668 ile ilişki kurar (7, 43-49).

$O_2^\cdot$ oluşur oluşmaz H_2O_2 'e dönüştürülür. Hem $O_2^\cdot$ hem de H_2O_2 özellikle mikroorganizmaları öldürmekte etkin değildir, ancak daha güçlü oksidanların oluşturulması için fagositler tarafından prekürsör olarak kullanılır. Örneğin $O_2^\cdot$ yüksek düzeyde toksik olan nitrojen türevlerini ($NOO^\cdot$) oluşturmak üzere nitroz oksit

ile etkileşirken, H_2O_2 Haber-Weiss döngüsü yolu ile hidroksil radikallerini oluşturmak üzere hücre içi demir ile reaksiyona girer. Hidroksil radikalleri hücre membranı lipidlerinin yıkımı, protein agregasyonu ve DNA hasarı ve/veya ayrılmasını da içeren ve geçmişte yanlış bir şekilde H_2O_2 'e atfedilen bir dizi toksik etkiden sorumludurlar (7, 43-49).



Şekil 7. Aktive fagositlerden oksidanların üretimi (solunumsal patlama).(44)

Miyeloperoksidaz Sistemi Tarafından Oluşturulan Klorinli Oksidanlar

Miyeloperoksidaz (MPO) sistemlerini kullanarak fagositik hücreler en güçlü klorinli oksidanları üretirler. Klor varlığında MPO, H_2O_2 'i hipoklorik aside (HOCl) dönüştürme konusunda benzeri olmayan bir kapasiteye sahiptir (Şekil 8). MPO bromid ve iyot gibi diğer halidlerin oksidasyonunu katalizlese de, fizyolojik koşullarda halihazırda mevcut olduğundan klorit temel substrat olmaya devam eder (7, 43-49).



Şekil 8. Miyeloperoksidaz ile H_2O_2 ' in metabolizması.(46)

Hipoklorik asit lipidler, proteoglikanlar ve hücre metabolizması için gerekli diğer hücre içi ve membran bileşenleri gibi bir dizi molekülü okside edebilir. Seçici hedefi, özellikle de tiyol grupları olmak üzere, membran proteinleri olmaya devam eder. Buna ek olarak, ömürleri kısa olan oksijen türevli serbest radikallerden ayırmak ve uzun ömürlü oksidan kloraminleri oluşturmak için endojen aminler ile reaksiyona girebilir (7, 43-49).

2.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

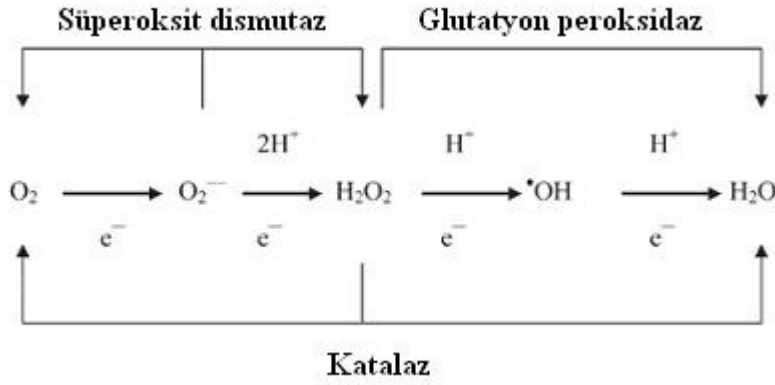
Oksidantlara karşı doğal korunma çok çeşitli enzimleri, oksijen radikallerini temizleyen küçük molekülleri ve geçiş durumundaki metal iyonlarını ortadan kaldıracı proteinleri içerir (47). Antioksidan koruyucu sistem başlıca iki major gruba ayrılır (45):

1-endojen mekanizmalar (başlıca enzimler)

2-ekzojen moleküler bileşenler

Enzimatik Antioksidan Sistemleri

Aerobik organizmalarda birçok enzim serbest radikallerin temizlenmesinde görevlidirler: süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz (45,49). Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar Şekil 9'da gösterilmiştir. Süperoksit dismutaz $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'yi , H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştüren reaksiyonu katalize etmektedir. Katalaz veya glutatyon peroksidaz; H_2O_2 'i ortamdan uzaklaştırırlar. Birçok dokuda katalaz aktivitesi peroksizomlarda bulunmaktadır ki bu da çoğu kez hidrojen peroksidin etkisiz hale getirilmesinde yeterli olmamaktadır. Bundan dolayı birçok dokuda H_2O_2 'nin etkisiz hale getirilmesi glutatyon peroksidaz ile olmaktadır(45,49).



Şekil 9. Serbest oksijen radikallerinin antioksidan enzimlerle nötralizasyonu(45)

Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistemleri

Çeşitli moleküller oksijen radikali toplayıcısı olarak davranabilirler. En aktifleri tüm hücre tiplerinde bulunan H_2O_2 , $OH^{\bullet}$ ve klorinli oksidanları toplayan, sülfid içeren bir tripeptid olan glutatyondur. Hücre membranını lipit peroksidasyonundan korumak için membranda stratejik bir konuma yerleşmiş olan α - tokoferol hidroksil grubu üzerinden lipit susbratlara saldırmayan düşük reaktifliğe sahip vitamin oluşturmak yolu ile radikal kaskatını kesintiye uğratar. Hem hücre içi hem de hücre dışı sıvılarda yaygın olarak bulunan C vitamini, glutasyon tarafından uzaklaştırılan senihidroaskorbik asit oluşturarak $O_2^{\bullet -}$ ve H_2O_2 'yi direkt olarak toplar. İlaveten ferritin, transferrin, seruloplazmin ve hatta albümin gibi inflamasyon proteinleri de, en reaktif oksijen radikallerinin oluşumunda rol alan geçiş durumundaki metal iyonlarını toplayarak, antioksidan aktivite gösterebilirler (47,49,50).

2.3.3. Oksidatif Stres Belirteçleri

SOR'un yol açtığı oksidatif hasar, protein, lipit ve nükleik asit gibi biyomolekülleri etkilediğinden; oksidatif stresin gösterilmesinde, bu biyomoleküllerin oksidatif ürünlerine yönelik testler kullanılmaktadır.

2.3.3.1. Total Lipit Hidroperoksit

Lipit hidroperoksit ürünlerinin oluşumu doymamış yağ asidi gruplarının peroksil radikali bağımlı zincir reaksiyonları sonucu ortaya çıkar. Hidroperoksitler

dengelemezler ve acrolein, 4-hidroksinonenal (HNE) ve malondialdehit (MDA) veya tiyobarbitürik asit-reaktif maddeler (TBARS) olarak adlandırılan aldehitler gibi daha küçük kararlı bileşiklere parçalanırlar. Hücre membranı fosfolipidlerinin serbest radikal saldırısından kaynaklanan araşidonik asit oksidasyonunun temel ürünü olan izoprostanlar yeni bir oksidatif stres belirleyicisi sınıfı olarak ortaya çıkmıştır (51,52).

2.3.3.2. İleri Protein Oksidasyon Ürünleri

Lipit peroksidasyon ürünlerinin kısa yarılanma ömrü göz önüne alınarak oksidatif stresi göstermede daha stabil ve yarılanma ömrü daha uzun olan protein oksidasyon ürünlerinin kullanımı artmıştır. Proteinlerin yeni oksidatif stres belirteci olarak AOPP plazmada tanımlanmıştır. AOPP'nin yanında, albumine bağlı plazma tiyol gruplarının oksidasyonu da kantitatif olarak protein oksidasyonunun en önemli göstergelerindendir (53). Solunumsal patlama reaksiyonu sonucunda aktive nötrofiller MPO ve H₂O₂ açığa çıkararak HOCl oluştururlar. HOCl hızlıca aminoasit ve proteinlerle reaksiyona girerek düşük moleküllü protein formları kloraminlerin ve AOPP'nin oluşmasına yol açarlar. AOPP oksidatif stresin yeni bir belirtecidir ve nötrofillerin aktivasyonunu arttıran bir inflamatuvar mediatör gibi çalışmaktadır. Sonuçta, AOPP klorinize oksidanların proteinlerle etkileşimi neticesinde oluşur ve oksidatif stresin proinflamatuvar etkilerini gösterirler (54). İn vivo fagositik hücreler MPO enzimi sayesinde klorinize oksidanlarını oluşturabilme ve salma yeteneğine sahiptirler ve klorinize oksidanların AOPP oluşumundaki yeri çok önemlidir (55). AOPP oksidatif hasar sonucu oluşan modifiye proteinleri temsil eden genel bir addır (56).

İleri Protein Oksidasyon Ürünleri kromatografi ile tespit edilmektedir. Kromatografide 2 absorpsiyon piki gözükür. Birincisi 340 nm dalga boyunda olan ve 600 kD moleküler ağırlığa denk gelen yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) AOPP ve ikincisi 80 kD moleküler ağırlığa denk gelen düşük moleküler ağırlıklı (LMW) AOPP'dir. HMW-AOPP protein elektroforezinde disülfid köprüleri ve/veya ditirozin çapraz bağlarından oluşan albumin agregatlarına bağlıdır. LMW-AOPP ise monomerik albuminden oluşmaktadır (50,57).

2.3.3.3. Serbest Tiyol Grupları

Tiyol grupları antioksidan sistemde bulunan ve SOR ve diğer serbest radikallerin (enzimatik veya nonenzimatik yollarla) tahrip edildiğini gösteren önemli bir grup antioksidandır (55). Plazma serbest tiyol grupları albuminin yapısında bulunur ve plazma antioksidan sistemlerinin en önemlisini oluşturur. HOCl toksisitesinin çok güçlü olması nedeniyle protein ve aminoasitlerin serbest fonksiyonel gruplarında (özellikle serbest tiyol gruplarında) oksidatif modifikasyona neden olmakta ve oksidatif strese bağlı doku hasarını ortaya çıkarmaktadır. Daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi oksidatif stresin arttığı durumlarda plazma serbest tiyol düzeylerinin azaldığı saptanmıştır (58).

2.3.3.4. Pirrolize Proteinler

Lipit peroksidasyonunun toksisitesi, peroksidasyon sırasında üretilen, doymamış veya dikarbonilik aldehitlerin açığa çıkmasına bağlanabilir. Lipit peroksidasyon ürünlerinden; malondialdehit, 4-hidroksi-2-alkenal, 4,5-epoksi-2-alkenal gibi aldehitler; proteinlerdeki reaktif grupları modifiye ederek, proteinler üzerinde okside lipit/amino asit reaksiyon ürünü (OLAARP) olarak adlandırılan birtakım değişikliklere yol açarlar. OLAARP oluşumu, proteinlerin varlığında, lipit peroksidasyonunun nihai sonucu olarak kabul edilmektedir. İmmünolojik yöntemlerle tanımlanan çok sayıda OLAARP içerisinden, piroller gibi sadece birkaçı, kimyasal spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilebilecek stabiliteye sahiptir. Proteinlerin serbest amino gruplarıyla lipit peroksidasyon ürünlerinin reaksiyonu sonucu yaygın şekilde oluşan pirrolize proteinler, organizmanın maruz kaldığı oksidatif stresin gösterilmesinde bir belirteç olarak kullanılabilir (59,60).

2.3.3.5. Miyeloperoksidaz

Miyeloperoksidaz, nötrofil ve monositlerin azurofil granüllerinde bulunan lizozomal bir enzimdir. Total nötrofil proteinlerinin % 5'ini oluşturur ve molekül başına iki demir atomu taşımaktadır (44). MPO'nun organizmadaki başlıca fonksiyonu, solunum patlaması sırasında, antimikrobiyal ajanları oluşturmaktır. NADPH oksidaz

olarak bilinen enzim kompleksi tarafından gerçekleştirilen solunum patlaması sırasında tüketilen oksijenin hepsi, NADPH'dan aktarılan elektronlarla süperoksit radikale indirgenmekte ve $O_2^{\cdot -}$ 'nin spontan dismutasyonu ile H_2O_2 oluşmaktadır. Nötrofiller tarafından üretilen H_2O_2 'nin çoğu, aktif nötrofillerden salınan MPO tarafından tüketilmektedir. MPO, fagozomlarda veya hücre dışında, halidler (Cl^- , I^- , Br^-)'in biriyle, özellikle klor iyonlarıyla, H_2O_2 'den HOCl oluşturmaktadır. MPO'nun antimikrobiyal aktivitesi, H_2O_2 ve Cl^- , I^- , Br^- gibi bir halidin varlığına bağlıdır. Halidler içerisinde en etkili iyodür olmasına rağmen; klor iyonları, nötrofillerde yüksek konsantrasyonda bulunur. Halidlerin oksidasyonu ile oluşan HOCl gibi kuvvetli oksidan ajanlar, mikroorganizmaları halojenasyon ve oksidasyon yoluyla etkisiz hale getirmektedirler. Organizmada HOCl üretimini katalizleyen tek enzim olan MPO, bir taraftan HOCl üretimiyle mikrobisid aktivite gösterirken; diğer taraftan enflamasyon alanında doku hasarına da neden olmaktadır. MPO, enzim inaktivasyonu, tirozil rezüdülerinin ve çapraz bağlı proteinlerin oluşumu, amino asit oksidasyonu ve lipidlerin kloridasyonu ile doku hasarına katkıda bulunmaktadır. Çünkü MPO- H_2O_2 -halid sistemiyle oluşan HOCl, kloramin, klorin, $HO\cdot$, 1O_2 ve ozon gibi toksik ajanlar, hücrenin dışına da salınmakta ve sağlıklı dokularda hasara neden olarak pek çok hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır (61,62).

2.4. OKSİDATİF STRES İLİŞKİLİ RENAL HASAR

Kronik böbrek hastalığı (KBH) tüm dünyada yaygın bir halk sağlığı problemidir ve Amerika Birleşik Devletleri'nde erişkin popülasyonun yaklaşık olarak %10'unu etkilemektedir. KBH'a neden olan primer hastalık tedavi edilse veya inaktif olarak görünse bile, SDBH'a progresyonun devam ettiği anlaşılmıştır. Bu da, ilk hasardan sonra kalan nefronlarda oluşan değişim ve adaptasyonların en sonunda skara neden olduğunu ve ilerleyen dönemde nefron kaybıyla sonuçlanan SDBH'a ilerlediğini desteklemektedir (5,8,12,13). Oksidatif stres çok sayıda böbrek hastalığının oluşum ve gelişim mekanizmasını oluşturur.

2.4.1. Glomerüler Hasarda Oksidatif Stresin Rolü

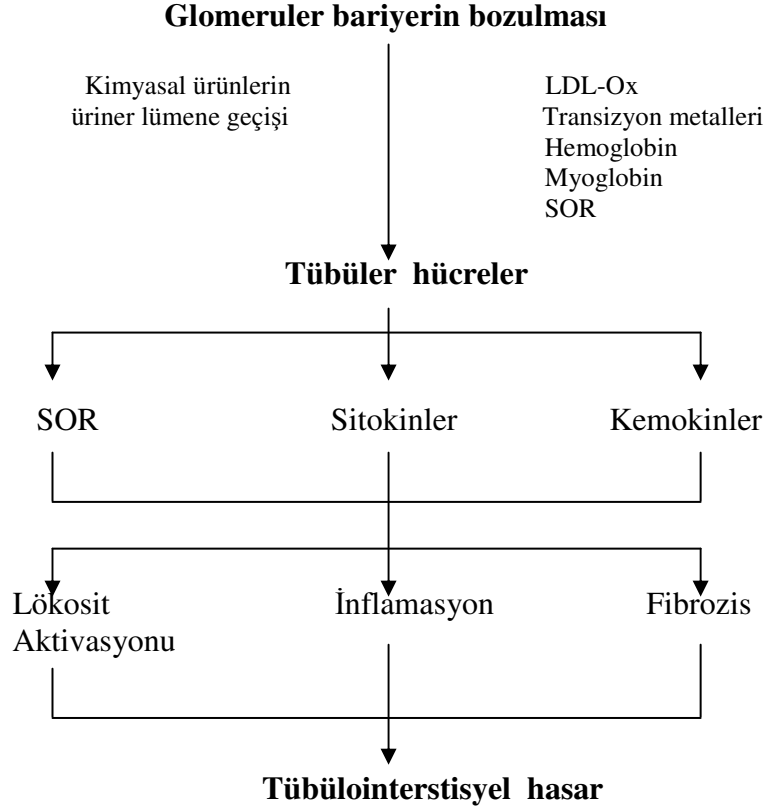
Oksidatif zedelenme SOR'un mezengiyal ve endotelial hücrelerdeki etkisine bağı olarak glomerül yapı ve fonksiyonlarını değıştirebilir. Glomerül oksidatif zedelenmeye proksimal tübül gibi diğef nefron bölümlerinden daha duyarlıdır. Hem doğal hem de okside olmuş LDL (düşük dansiteli lipoprotein) (LDL-ox) formları oksidatif stresin aracılık ettiğı glomerül hasarından sorumlu olabilir. Oksidatif stres, temelde LDL'nin glomerülde birikimi ile ilişkili olarak, hiperlipoproteinemi tarafından indüklenen böbrek hasarına katkıda bulunur. Takiben LDL'nin mezengiyal hücreler tarafından oksidasyonu gerçekleşerek, antioksidanlar tarafından önlenen bir etki olduğı gösterilen, endotelial ve mezengiyal hücrenin apoptoz yolunu aktiveştirir. Saf LDL'nin sıçanların glomerül hücrelerinde SOR üretimini indüklediğı gösterilmiştir. Glomerüler hastalığın ilerleyişi, biyokimyasal düzeyde, oksidatif stres ile daha da kötüleştirilir. Birçok olguda kötüleşme hızının diyetle basitçe antioksidan desteğinin eklenmesi ile daha kabul edilebilir bir seviyeye doğru yavaşlatılabileceğine dair kanıtlar vardır (51,63,64).

2.4.2. Tübulointerstisyel Hasarda Oksidatif Stresin Rolü

Tübulointerstisyel zedelenme, bozukluğun köken aldığı kompartmandan veya etyolojik faktörden bağımsız olmak üzere, kronik böbrek hastalıklarının sürekli gözlenen bir bulgusudur. Tübüler hücrelerin LDL-ox'a maruz kalması pro-oksidan koşulların indüksiyonuna bağı olarak tübulointerstisyel hasar ile sonuçlanabilir. Daha sonra bu oksidatif uyaran, glomerül bariyerinin bozulduğı bir dizi glomerülopatide üriner boşlukta gözlenen iki hem pigmentini oluşturacak şekilde hemoglobin ve miyoglobindeki hem gruplarının degradasyonunu katalizleyen hem-oksijenazın aktivasyonunu indükler. Ardından gelen demir iyonların serbestleşmesi tübüllerde hidroksil radikallerinin üretimine ve lipid peroksidasyonuna neden olur (63-65).

Miyoglobiniüri sırasında, tübüler hücrelerde hidrojen peroksit üretiminde artış ve GSH'da dramatik bir düşüş olduğı gösterilmiştir. Bazı çalışmalar hem proteini ile indüklenen akut böbrek yetmezliğı sırasında proksimal tübüldeki lipid peroksidasyonuna neden olan serbest radikallerin oluşumundan sorumlu metabolik

basamağın sorumlusu olarak terminal mitokondriyal elektron transport zincirini işaret etmektedir (63-65).

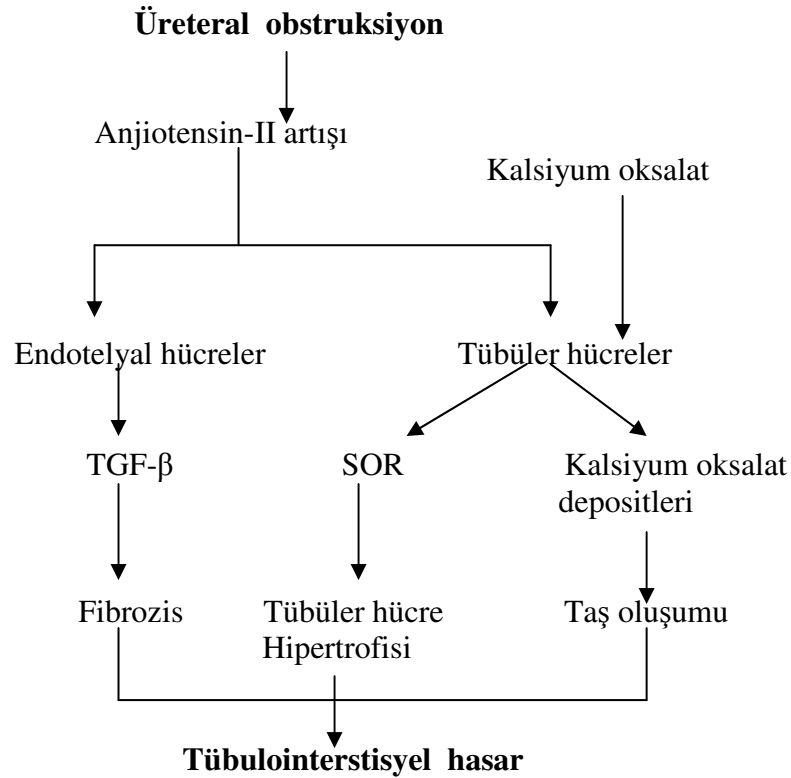


Şekil 10. Oksidatif stresle oluşan tübülointerstisyel hasar. LDL-Ox: oksidize düşük dansiteli lipoprotein; SOR: serbest oksijen radikalleri (63)

Böbrek korteksinin interstisyel boşluğunda makrofajların birikimi, tübüler hasar ve interstisyel fibrozisin gelişiminde patojenik bir rol oynar. Proksimal tübül epitelin, anatomik pozisyonu ve kemotaktik sitokinler, kemokinler ve diğer inflamatuvar mediyatörleri üretme kapasitesine sahip olduğundan, interstisyel makrofaj infiltrasyonuna aracılık ettiği düşünülmektedir. SOR'un, lökositlerin de olaya katılması ile sonuçlanacak şekilde, tübüler epiteldeki bu mediyatörlerin gen ekspresyonlarını indüklediği bildirilmiştir (63). Tübülointerstisyel hasar oluşumunda SOR'un rolü şekil 10'da gösterilmiştir.

Üreteral obstruksiyon, böbrekte hasar oluşumunun oksidatif stres oluşumu ile yakından ilgili olduğu bir başka renal değişimdir. SOR, obstruktif nefropati ile ilişkili tübülointerstisyel inflamasyonda önemli bir role sahip olabilir. Tam üreteral

obstruksiyondan kaynaklanan mekanik bozukluklar proinflatuvar ve tübulointerstisyel fibrozisden kaynaklanan tübüler zedelenmeye neden olur. Üreteral obstruksiyonun düzelmesinden sonra SOR'un üretimindeki artış fibrojenik sitokinler ve kemotaktiklerin aşırı ekspresyonuna neden olur ki, bu etki kısmen böbrekteki oksidatif strese dayanarak açıklanabilir. Obstruksiyon gelişen böbreğin tübüler hücrelerindeki CAT ve SOD antioksidan enzimlerinde down-regülasyon gelişimi böbreğin oksidatif strese daha duyarlı olmasına neden olur, bu süreç sodyumun azalması ile şiddetlenebilir. Anjiotensin II'de obstruktif nefropati dahil böbrek hastalıklarının ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. Anjiotensin II membrana bağlı NADPH-oksidazın aktivasyonuna ve ardından süperoksit oluşumuna, sonra da böbrek tübül hücrelerinin hipertrofisine aracılık eder. Buna ek olarak, obstruktif nefropatide anjiotensin II tarafından TGF- β ve TNF- α ekspresyonunun up-regülasyonu da bildirilmiştir(66).



Şekil 11. Oksidatif stresle ilişkili tübulointerstisyel hasarda üreteral obstruksiyon ve kalsiyum oksalatın rolü. TGF- β : transforming growth faktör- β ; SOR: serbest oksijen radikalleri (63)

Kalsiyum oksalat taşları obstruktif üropatinin sık örneklerindendir. Oksalatın taş oluşumunda patojenik rolü ile birlikte, lipid peroksidasyonuna yol açan serbest radikalleri de üretebildiği bildirilmiştir. Hiperoksalüri ile indüklenen lipid peroksidasyonuna GSH düzeylerinde azalmanın eşlik ettiğinin gösterildiği hayvan modellerinde yapılan çalışmalar bu veriler ile uyumlu idi. Diğer yandan, tübüler kalsiyum oksalat birikimlerinin oksidatif stresi tetiklediği de gösterilmiştir (66). Üreteral obstruksiyona bağlı tübülointerstisyel hasarda oksidatif stresin rolünü içeren varsayımsal bir şema şekil 11’de gösterilmiştir.

2.4.3. Endotel Hasarında Oksidatif Stresin Rolü

Serbest oksijen radikallerinin üretiminde artış damar düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve hipertansiyon gelişimi ile ilişkilidir. SOR’un vasküler yatakta etkilerinin oluşmasına nitrik oksit (NO) aracılık eder. Vasküler süperoksit, NO seviyesini azaltarak vazodilatasyon mekanizmasını bozar. Anjiotensin II, NADPH-oksidad aktivasyonu yolu ile endotel ve mezenjiyal hücreler tarafından süperoksit üretilmesini uyarabilir. Artan hücre dışı süperoksit, NO’ya olan büyük ilgisi sayesinde, peroksinitrite dönüştürülerek hızla ortamdan uzaklaştırılır. Glomerülün içinde, NO’nun biyolojik etkinliğinin azalması onun anjiotensin II’nin mezenjiyal kontraksiyon ve arterioler tonusu üzerindeki etkilerini karşılama kapasitesini sınırlandırır. İkincisi, potasyum geçirgenliğini arttırarak damar düz kaslarının relaksasyonunu sağlar. Hidrojen peroksit de klor kanallarını, kontraksiyonu ve mezenjiyal hücrelerin proliferasyonunu uyarabilir. Dolayısıyla glomerüler filtrasyon hızında ilerleyici azalmaya katkıda bulunabilir(63).

3. HASTALAR VE YÖNTEM

Bu çalışma Şubat 2009 – Şubat 2010 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Nefroloji Bilim Dalında prospektif olarak yapıldı. Çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (02.12.2008 tarihli 2008/622 nolu karar). Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklendi (proje no: TST-09-844). Çocuklara ve/veya ailelerine çalışma dahilinde yapılacak işlemler ve çalışmanın amacı anlatılarak onayları alındı.

Çalışmaya Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Nefroloji Bilim dalında VUR tanısı alan 11'i erkek, 33'ü kız olmak üzere toplam 44 çocuk alındı. Ayrıca 4'ü erkek, 14'ü kız 18 sağlıklı çocuktan kontrol grubu oluşturuldu.

Hastaların VUR tanıları VSUG ile konuldu. VSUG ile hastaların reflü dereceleri grade I, II, III, IV ve V olarak derecelendirildi. Tüm hastalara DMSA çekilerek renal skar varlığı araştırıldı. VUR tanısı konulan tüm hastalardan çalışma öncesi idrar kültürü alındı. Çalışmaya idrar kültürü steril olan hastalar alındı.

3.1. Çalışmaya dahil etme kriterleri

- 1- Primer VUR olması,
- 2- İdrarın steril olması,
- 3- Eşlik eden sistemik hastalığın bulunmaması,
- 4- Son 1 ay içinde antibiyotik ya da antiinflamatuvar ilaç tedavisi almamış olması.

3.2. Çalışma dışı bırakma kriterleri

- 1- Sekonder VUR olması,
- 2- İdrar yolu enfeksiyonu olması,
- 3- Eşlik eden sistemik hastalık olması,
- 4- Son 1 ay içerisinde geçirilmiş enfeksiyöz hastalık olması,
- 5- Son 1 ay içerisinde antiinflamatuvar ilaç kullanmış olması.

Hasta ve kontrol grubunun kan örnekleri randomize olarak alındı. Kan örnekleri antekübital venden alınarak yapılacak biyokimyasal ölçümlere uygun şekilde antikoagülanlı (EDTA/heparin) ve düz tüplerde toplandı. Antikoagülanlı ve atikoagülansız örnek tüpleri, 30 dakika içerisinde, 2000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Ayrılan plazma ve serum örnekleri 2 ml'lik konik tüplere konup, ağzı kapatılarak çalışma gününe kadar -20 °C'de bekletildi.

Çalışma gününe kadar alikotlar halinde dondurularak saklanan heparinli plazma örneklerinde MPO aktivitesi, total lipit hidroperoksit ve tiyol düzeyleri tayin edildi. EDTA'lı plazma örnekleri AOPP tayininde kullanıldı. Serum örneklerinde ise pirrolize protein seviyeleri ölçüldü.

3.3. Miyeloperoksidaz aktivitesi tayini

Plazma MPO aktivitesi Bradley ve ark (67) tarafından geliştirilen metot ile ölçüldü. Peroksidaz substratı olan O-dianisidin'in H_2O_2 varlığında MPO tarafından oksitlenmesiyle oluşan sarı-turuncu renkli ürünün renk şiddetinin spektrofotometrede 460 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanan yöntemle MPO seviyeleri tayin edildi (67).

Çalışma

MPO aktivitesi seviyesi aşağıdaki kimyasal maddelerin ve işlemlerin sırasıyla uygulanması ile tespit edildi.

	NUMUNE	KONTROL
% 0.0005 H ₂ O ₂ substratı	2.9 ml	2.9 ml
Saf su	-	0.1 ml
Plazma	0.1 ml	-

Pipetleme işlemlerinden hemen sonra, numune ve kontrol tüplerindeki OD (ortalama dağılım) artışı, saf su körüne karşı, 25°C’de ve 460 nm dalga boyunda, 10 dk izlendi.

Hesaplama

Numune ve kontrol tüpleri için, $\Delta OD/dk$ (ortalama dağılım farkı) değerleri hesaplandı ve numune $\Delta OD/dk$ değerlerinden kontrol değeri çıkarılarak, net $\Delta OD/dk$ değerleri bulundu.

Bir ünite MPO, standart deney şartlarında, dakikada bir mikromol O-dianisidinin oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı (Ü/L; mmol O-dianisidin/ dk/L) olarak tanımlandı.

Okside O-dianisidinin molar ekstinksiyon katsayısı ($1.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) kullanılarak, plazma örneklerinin net $\Delta OD/dk$ değerlerinden, ünite birimine geçildi.

Plazma örneklerinde tayin edilen MPO aktivitesi, bir litre plazma başına verildi (Ü/L).

3.4. Total Lipit Hidroperoksit tayini

Plazmada lipit hidroperoksit tayini Nourooz-Zadeh (68) tarafından geliştirilen FOX yöntemine göre yapıldı. Metodun prensibi, asidik ortamda peroksitler tarafından oluşturulan ferrik (Fe^{+3}) iyonun ksilenol oranj (XO) ile verdiği mavi-mor renkli kompleksin renk şiddetinin spektrofotometrik olarak 560 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır (68).

Çalışma

Total lipid hidroperoksit seviyesi aşağıdaki kimyasal maddelerin ve işlemlerin sırasıyla uygulanması ile tespit edildi.

	NUMUNE	NUMUNE KÖRÜ
Plazma	90 µl	90 µl
10 mM TCEP	-	10 µl
Saf su	10 µl	-
Tüplerin ağzı kapatılarak karıştırıldı ve 20-25°C'de çalkalamalı su banyosunda 30 dk inkübe edildi.		
FOX reaktifi	900 µl	900 µl
Tüplerin ağzı kapatılarak karıştırıldı ve 20-25°C'de 60 dk inkübe edildi.		
Tüpler 10.000 devirde 10 dk santrifüjlendi, süpernatantların OD'si 560 nm'de saf su körüne karşı okundu.		

Hesaplama

Numune OD değerlerinden kontrol OD'leri çıkarılarak ΔOD değerleri bulundu. Fe^{3+} .XO kompleksinin molar ekstinksiyon katsayısı ($4.31 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$) ve dilüsyon faktörü kullanılarak, plazma örneklerinin $\Delta OD/dk$ değerlerinden, total lipid peroksit düzeyleri hesaplandı ve bir litre plazma başına mikromol olarak verildi ($\mu mol/L$).

3.5. Pirrolize protein tayini

Pirrolize protein Hidalgo ve ark (59) tarafından geliştirilen ve Martinez-Cruz ve ark (69) tarafından modifiye edilen Ehrlich reaktifinin kullanıldığı metoda göre tayin edildi. Metodun prensibi, pirrolize proteinlerin, asidik ortamda ve yüksek sıcaklıkta, DMAB ile etkileşimi sonucu oluşan mavi-mor renkli Ehrlich reaksiyon ürünlerinin renk şiddetinin spektrofotometrik olarak 570 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır (60,69).

Çalışma

Pirrolize protein seviyesi aşağıdaki kimyasal maddelerin ve işlemlerin sırasıyla uygulanması ile tespit edildi.

NUMUNE	
Serum	0.5 ml
Saf su	2.0 ml
Tüplerin ağzı kapatılarak 30 sn vorteksle karıştırıldı.	
% 30 TCA	0.5 ml
Buz üzerinde 10 dk presipite edilen tüpler, 10.000 devirde 10 dk santrifüjlendi ve süpernatantlar döküldü.	
Serum fizyolojik	1.0 ml
Protein pelletleri sonikasyondan sonra vorteksle parçalanıp 5 dk santrifüjlendi. Serum fizyolojik ile yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı.	
6 M Guanidin HCl	2.5 ml
Tüpler çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 20-30 dk inkübe edildi ve çözünmeyen materyal santrifüjle uzaklaştırılıp süpernatantlar alındı.	
Çalışmaya süpernatantlar ile devam edildi.	

	NUMUNE	KONTROL
Süpernatant	1.0 ml	1.0 ml
Ehrlich reaktifi	0.2 ml	-
Saf su	-	0.2 ml
Çalkalamalı su banyosunda 60°C’de 60 dk inkübe edilen tüplerin OD’si, guanidinHCl körüne karşı, spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okundu.		
Ayrıca, geri kalan süpernatantlarda da 280 nm’de protein tayini yapıldı.		

Hesaplama

Numune OD değerlerinden kontrol OD’leri çıkarılarak ΔOD değerleri bulundu. Pnl’nin (pirol norlösin, pirrolize protein türü) DMAB (dimetilenaminobenzaldehit) ile oluşturduğu Ehrlich reaksiyon ürününün molar ekstinksiyon katsayısı ($35.000 M^{-1} cm^{-1}$) ve dilüsyon faktörü kullanılarak pirrolize protein düzeyleri hesaplandı. Serum pirrolize protein değerleri, mg protein başına verildi (nmol/mg protein).

3.6. AOPP tayini

Plazma AOPP düzeyleri Witko-sarsat ve ark (70) tarafından geliştirilen metot ile tayin edildi. Metodun prensibi başta albumin olmak üzere plazma proteinlerinin HOCl, RNH-Cl gibi klorlu oksidanlarla oluşturduğu çapraz bağlanma ürünlerinin potasyum iyodürü oksitlemesi ve açığa çıkan triiyodid iyonunun spektrofotometrik olarak 340 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır. Değerlendirme kloramin T standart eğrisi kullanılarak yapılır (70).

Çalışma

AOPP seviyesi aşağıdaki kimyasal maddelerin ve işlemlerin sırasıyla uygulanması ile tespit edildi.

	NUMUNE	KONTROL	KÖR
0.015 M PBS	0.8 ml	0.85 ml	1.0 ml
Plazma	0.2 ml	0.2 ml	-
Asetik asit	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Tüpler, çalkalamalı su banyosunda, 25°C'de 2 dk inkübe edildi.			
1.16 M KI	0.05 ml	-	0.05 ml
Potasyum iyodür (KI) ilavesinden hemen sonra numune ve kontrol tüplerinin OD'leri reaktif körüne karşı 340 nm'de okundu.			

Hesaplama

Numune ve kontrol tüplerinin absorbansları kullanılarak ΔOD değerleri bulundu. Kloramin T ile hazırlanan standart grafik yardımıyla plazma örneklerinin ΔOD değerlerinden AOPP seviyelerine geçildi ve dilüsyon faktörüyle çarpılarak gerçek plazma değerleri bulundu.

Stok Kloramin T (0.1 mM) çözeltisi, saf su ile uygun şekilde dilüe edilerek, 2.5; 5.0; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 75 ve 100 mmol/L konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı. Ölçüm sırasında PBS ve plazma yerine her standarttan 1.0 ml alarak numune gibi çalışıldı. Kloramin T konsantrasyonuna karşılık gelen OD değerleriyle standart grafik çizildi

Plazma AOPP konsantrasyonları, litrede mikromol kloramin T ekivalanı (kloramin $\mu\text{mol/L}$) olarak verildi.

3.7. Tiyol tayini

Plazma tiyol seviyeleri Hu ve ark (71) tarafından modifiye edilen metoda göre yapıldı. Metodun prensibi proteine bağlı/serbest tiyol tarafından Elman reaktifi (5,5'-di tiyobis-2- nitrobenzoik asit; DTNB)'nin redüklenmesiyle açığa çıkan koyu sarı renkli TNB'nin renk şiddetinin spektrofotometrik olarak 412 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır (71).

Çalışma

Tiyol seviyesi aşağıdaki kimyasal maddelerin ve işlemlerin sırasıyla uygulanması ile tespit edildi.

	NUMUNE	KONTROL	KÖR
0.1 M Tris-HCl	1.0 ml	1.0 ml	1.05 ml
Metanol	-	0.05 ml	-
Plazma	0.05 ml	0.05 ml	-
10 mM DTNB	0.05 ml	-	0.05 ml
Tüpler, 25°C'de tam 15 dk inkübe edildikten sonra kontrol ve numune tüplerinin absorbansı, kör tüpüne karşı, 412 nm dalga boyunda ölçüldü.			

Hesaplama

Numune ve kontrol tüplerinin absorbansları kullanılarak ΔOD değerleri hesaplandı. GSH ile hazırlanan standart grafik yardımıyla plazma örneklerinin ΔOD değerlerinden tiyol seviyelerine geçildi.

Stok GSH (1.0 mM) çözeltisi saf su ile uygun şekilde dilüe edilerek 100; 200; 400; 600; 800 ve 1000 mmol/L konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı ve numune gibi çalışıldı. GSH konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleriyle standart grafik çizildi.

Standart grafik üzerinden bulunan plazma tiyol seviyeleri, litrede mmol tiyol olarak verildi ($\mu\text{mol/L}$).

3.8.İstatistik

Tüm istatistiksel analizler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 11.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Öncelikle **Kolmogorov-Smirnov testi** kullanılarak tüm değişkenlerin dağılımı değerlendirildi ve normal dağılım gösteren değişkenler ortalama $\pm$ SD, anormal dağılım gösteren değişkenler ise ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda parametrik değerler için **student's t testi**, parametrik olmayan değerler için **Mann-Whitney U testi**; ikiden fazla grup karşılaştırmalarında parametrik değerler için **ANOVA** parametrik olmayan değerler için **Kruskall Wallis ANOVA** testleri uygulandı. Tüm istatistiksel analizlerde $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya yaşları 2 ay ile 17 yıl arasında 44 hasta ve 6 ay ile 13^{4/12} yıl arasında 18 sağlıklı çocuk alındı. VUR'lu vakaların yaş ortalaması 6.4 ± 3.8 yıl olup 11'i erkek, 33'ü kız idi. Kontrol grubunun ise yaş ortalaması 6.7 ± 4.1 yıl olup 4'ü erkek, 14'ü kız idi. Yaş ve cinsiyet açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$, Tablo3).

VUR grubunda plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit, serum pirrolize protein ve plazma tiyol düzeyleri sırasıyla 95.9 ± 17.0 Ü/L, 62.9 ± 16.9 kloramin $\mu\text{mol/L}$, 37.8 ± 10.4 $\mu\text{mol/L}$, 0.89 ± 0.20 nmol/mg protein ve 334.3 ± 54.6 $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü. Kontrol grubunda ise plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit, serum pirrolize protein ve plazma tiyol düzeyleri sırasıyla 55.2 ± 14.8 Ü/L, 28.2 ± 8.3 kloramin $\mu\text{mol/L}$, 19.8 ± 5.5 $\mu\text{mol/L}$, 0.58 ± 0.17 nmol/mg protein ve 358.6 ± 52.1 $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü.

Tablo 3: Hasta ve kontrol gruplarının MPO, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol değerlerinin karşılaştırılması

Çalışma parametreleri	Çalışma grupları	
	Hasta (n:44)	Kontrol (n:18)
Yaş (yıl)	6.7 ± 4.1	6.4 ± 3.8
Cins (K/E)	33/11	14/4
MPO (Ü/L)	95.9 ± 17.0*	55.2 ± 14.8
AOPP (kloramin µmol/L)	62.9 ± 16.9*	28.2 ± 8.3
Lipit hidroperoksit (µmol/L)	37.8 ± 10.4*	19.8 ± 5.5
Pirrolize protein (nmol/mg protein)	0.89 ± 0.20*	0.58 ± 0.17
Tiyol (µmol/L)	334.3 ± 54.6	358.6 ± 52.1

* p<0.05, kontrol grubu ile kıyaslandığında

Hasta ve kontrol grupları plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit, serum pirrolize protein ve plazma tiyol düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; plazma tiyol düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (p>0.05, Tablo3). Buna karşılık hasta grubunun plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit ve serum pirrolize protein düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edildi (p<0.05, Tablo3).

Tablo 4: Skarlı ve Skarsız hasta gruplarının MPO, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol değerlerinin karşılaştırılması

Çalışma parametreleri	Çalışma grupları		
	Skar (-) (n:12)	Skar (+) (n:32)	Kontrol (n:18)
Yaş (yıl)	6.1±4.5	6.9±4.0	6.4 ± 3.8
MPO (Ü/L)	92.1±14.9*	97.4±17.8*	55.2 ± 14.8
AOPP (kloramin µmol/L)	61.6±14.5*	63.3±17.8*	28.2 ± 8.3
Lipid hidroperoksit (µmol/L)	35.5±13.0*	38.7±9.3*	19.8 ± 5.5
Pirrolize protein (nmol/mg protein)	0.85±0.18*	0.91±0.21*	0.58 ± 0.17
Tiyol (µmol/L)	317.0±70.4	340.8±47.0	358.6 ± 52.1
* p<0.05, kontrol grubu ile kıyaslandığında			
** p>0.05 skarlı ve skarsız grup karşılaştırıldığında			

Hasta grubu, sintigrafilerinde renal skar varlığına göre, skar olan ve olmayanlar olarak 2 gruba ayrıldı. Skarlı, skarsız ve kontrol grupları yaş, plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit, serum pirrolize protein ve plazma tiyol

düzeyleri açısından karşılaştırıldığında yaş dağılımı ile plazma tiyol düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0.05$, Tablo4). Skarsız grubun ve skarlı grubun plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit ve serum pirrolize protein düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($p<0.05$, Tablo4). Skarlı ve skarsız grupları yaş, plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit, serum pirrolize protein ve plazma tiyol düzeyleri açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilemedi ($p>0.05$, Tablo4).

Tablo5: Hafif, Orta ve Ağır reflülü hastaların MPO, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol değerlerinin karşılaştırılması

Çalışma parametreleri	Çalışma grupları			
	Grade I-II (n:6)	Grade III (n:27)	Grade IV-V (n:11)	Kontrol (n:18)
Yaş (yıl)	6.7±3.3	7.4±4.1	4.8±4.2	6.4 ± 3.8
MPO (Ü/L)	98.0±20.1*	96.3±15.1*	93.7±21.6*	55.2 ± 14.8
AOPP (kloramin µmol/L)	60.6±12.7*	64.4±17.9*	60.7±17.5*	28.2 ± 8.3
Lipit hidroperoksit (µmol/L)	43.6±12.1*	37.7±10.4*	34.9±8.9*	19.8 ± 5.5
Pirrolize protein (nmol/mg protein)	0.89±0.23*	0.90±0.17*	0.89±0.2*	0.58 ± 0.17
Tiyol (µmol/L)	360.9±43.4	331.4±58.6	326.8±49.2	358.6 ± 52.1
* $p<0.05$, kontrol grubu ile kıyaslandığında				
** $p>0.05$ hafif, orta ve ağır reflü grupları karşılaştırıldığında				

Hastalar reflü derecesine göre grade I-II: hafif; grade III: orta ve grade IV-V: ağır reflü grubu olarak sınıflandırıldı. Hafif, orta, ağır ve kontrol grupları yaş, plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit, serum pirrolize protein ve plazma tiyol düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; yaş dağılımı ile plazma tiyol düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0.05$, Tablo5). Hafif, orta ve ağır reflü dereceli grupların plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit ve serum pirrolize protein düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($p<0.05$, Tablo5). Hafif, orta ve ağır reflü dereceli hasta grupları kendi aralarında yaş, plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit, serum pirrolize protein ve

plazma tiyol düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0.05$, Tablo5).

Hastalar reflünün tek ya da çift taraflı olmasına göre 2 gruba ayrıldı. Tek taraflı ve çift taraflı reflü olan gruplar ile kontrol grubu yaş, plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit, serum pirrolize protein ve plazma tiyol düzeyleri açısından karşılaştırıldığında yaş dağılımı ile plazma tiyol düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0.05$, Tablo6). Tek ve çift taraflı reflü olan grupların plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit ve serum pirrolize protein düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($p<0.05$, Tablo6). Tek ve çift taraflı reflüleri olan gruplar kendi aralarında yaş, plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, plazma lipid hidroperoksit, serum pirrolize protein ve plazma tiyol düzeyleri açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0.05$, Tablo6).

Tablo 6 : Tek taraflı ya da çift taraflı reflüsü olan hastaların MPO, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol değerlerinin karşılaştırılması

Çalışma parametreleri	Çalışma grupları		
	Tek taraflı reflü (n:22)	Çift taraflı reflü (n:22)	Kontrol (n:18)
Yaş (yıl)	7.9±4.1	5.5±3.8	6.4 ± 3.8
MPO (Ü/L)	96.6±18.7*	95.3±15.5*	55.2 ± 14.8
AOPP (kloramin µmol/L)	67.3±19.0*	58.6±13.7*	28.2 ± 8.3
Lipit hidroperoksit (µmol/L)	37.8±9.3*	37.8±11.6*	19.8 ± 5.5
Pirrolize protein (nmol/mg protein)	0.89±0.21*	0.90±0.20*	0.58 ± 0.17
Tiyol (µmol/L)	332.8±45.2*	335.8±63.7	358.6 ± 52.1
* $p<0.05$, kontrol grubu ile kıyaslandığında			
** $p>0.05$ tek ve çift taraflı reflü grupları karşılaştırıldığında			

5. TARTIŞMA

Vezikoüreteral reflü idrarın mesaneden üreterlere doğru geri kaçması olarak tanımlanır ve çocukluk çağında sık olarak görülmektedir (2,13). Hodson ve Edwards 1960 yılında ilk defa VUR ile renal skar arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir (72). VUR'a bağlı renal skar ve reflü nefropatisi gelişmesinin patogenezi son 50 yıldır klinisyenlerin çok ilgisini çekmiş, bu konuya hem hayvan deneyleri hem de klinik çalışmalar ile ışık tutulmaya çalışılmıştır.

Böbrek skarı ile ilgili klinik bilgilerin çoğu VUR'u olan hastalar ile yapılan çalışmalardan gelir. Klinik çalışmalar İYE, VUR ve böbrekte skar oluşumu arasında sıkı bir ilişki olduğunu doğrulamaktadır (1,20). Eski çalışmalar VUR ve semptomatik İYE öyküsü olan çocukların %30 ila %60'ında ilk incelemeler sırasında böbrek skarı olduğunu bildirmektedir. Böbrek skarları genellikle 5 yaşından önce olmak üzere yaşamın erken döneminde ortaya çıkmaktadır (<2 yaş: %23.7, 2-4 yaş: %9.8, ≥5 yaş %4.6) (73-78).

Bebeklerin böbreklerinde yüksek böbrek skar oluşma riski muhtemelen çok faktörlü bir durumdur. Birincisi, daha büyük olanlara kıyasla 1 yaş altı bebeklerde İYE'lerin piyelonefrit ile komplike olma oranları yüksektir (1,20). Aslında, çocukluk

döneminde meydana gelen tüm ateşli İYE'lerin yaklaşık yarısı 1 yaş veya daha küçük çocuklarda ortaya çıkar (24). Bu durum kısmen İRR görülme sıklığının yüksek olmasına bağlıdır (79). Bebeklerde renal skar oluşumuna katkısı olan bir diğer faktör de bakterinin üriner sisteme erişimine izin verecek ve bakterisidal aktiviteyi düşürecek şekilde immün sistem gelişimin yetersiz olmasıdır. Son olarak, spesifik olmayan belirti ve bulgulara sahip bebeklerde İYE'lerin tanısı sıklıkla gecikir (1,24). Tüm bu faktörler hasar ve skar oluşum riskini artırır.

Yeni veya ilerleyici skarlar hemen her zaman geçirilmiş İYE ve en sık da klinik piyelonefrit ile ilişkilidir (24). VUR'un şiddeti ve böbrek skarı arasındaki korelasyon iyi bilinmektedir. Bununla birlikte yeni gelişen veya daha önceden var olan böbrek skarları VUR bulunmayan semptomatik İYE'ye sahip bazı çocuklarda da bildirilmiştir (78). Piyelonefrit atakları ile böbrek skarı görülme sıklığı arasında açık bir ilişki bildirilmiştir (80). Edinilmiş böbrek skarlarında enfeksiyonun rolü için ek klinik destek DMSA ile gösterilmiş akut piyelonefritli çocuklarda yapılan ileriye dönük çalışmalardan elde edilmiştir. Takip için yapılan DMSA taramaları reflüsü olan ve olmayan böbreklerde yeni skar oluşumunu göstermiştir. Tüm yeni skarlar ilk taramada akut inflamasyon bulunan bölgelere karşılık gelen alanlarda oluşmuştur (24).

Sonuç olarak yapılan klinik çalışmalarda VUR'da skar oluşumu için en önemli risk faktörleri: 1-) geçirilmiş ateşli İYE'nin varlığı / sıklığı, 2-) yüksek dereceli reflü olması (grade IV-V) ve 3-) küçük yaş, (<2 yaş: %23.7, 2-4 yaş: %9.8, ≥5 yaş %4.6), olarak bulunmuştur (73-78).

Orta ya da ciddi VUR olanlarda İRR ve bakteriürinin piyelonefritik skar oluşumuna katkısı olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır. Buna rağmen renal yetmezliği olup radyolojik olarak RN olan hastaların en az %30-40'ında İYE hikayesi yoktur (1). Bu durum, steril reflünün nasıl renal skar oluşturduğunun açıklanması gerekliliğini göstermektedir. Steril reflünün böbrekte skar oluşturabileceği teorisi, intramural üreterin açığa çıkarılması ile reflünün oluşturulduğu deneysel domuz modeline dayanarak, Hodson ve ark (30) tarafından öne sürülmüştür. Bu çalışmada reflünün güçlendirilmesi için üretra çevresine bir halka yerleştirilerek mesane çıkışında obstrüksiyon oluşturulmuş ve yüksek basınçlı reflü elde edilmiştir. Steril reflüye

bağlı böbrek skarlarının, VSUG'de İRR olduğu gösterilen alanlara karşılık gelen alanlarda en yoğun olduğu gösterilmiştir (30). Böbrek skarı patogenezinde steril reflünün rolü aleyhindeki kanıtlar Ransley ve Ridson (33) tarafından multi-papiller domuz modeli kullanılarak yapılan çalışmalardan gelmektedir. Bu çalışmada Hodson ve ark (30) modelinde kullanılan yöntemle idrar reflüsü tetiklenmiştir. Bununla birlikte, mesane çıkış obstruksiyonu uygulanmamıştır, yani yüksek basınçlı reflü yoktur. Ransley ve Ridson (33) steril idrar reflüsü olan hayvanlarda skarlaşma bulamamıştır. Bunun yerine primer reflüde olduğu gibi işeme basıncı normal olduğunda skarın sadece VUR ve İRR ile birlikte üriner enfeksiyon bulunduğunda oluştuğunu bulmuşlardır.

Domuzların multi-papiller böbreklerinde İRR sadece spesifik morfolojik özelliklere sahip papillalarda oluşur. Ransley ve Ridson domuzlarda (31), çocuklarda (32) olduğu gibi, iki temel papilla tipi keşfetmiştir. Bazıları basittir, üstünde papilla duktuslarının oluklu orifisler ile oblik olarak açıldığı konveks kaliks yüzeylerinin bulunduğu konik yapılardır. Bu papilla İRR'nin oluşmasına imkan vermez. Bunun aksine, düz veya konkav uçları olan daha büyük papillalarla birleşen ve papilla duktuslarının kalikse boşluklu orifisler ile açıldığı böbrek papillaları İRR'nin oluşmasına izin verir. Bu birleşik veya kombine papillalar çoğunlukla skarın daha sık görüldüğü polar bölgelerde bulunur. Diğer nedenler ile ölen çocuklarda gerçekleştirilen post-mortem çalışmalar insan böbreklerinin 2/3'ünde reflü potansiyeline sahip en az bir papilla olduğunu ortaya çıkarmıştır (32). Reflüye yol açmayan papillanın reflüye sebep olan papillaya dönüşümü enfekte idrar reflüsünden veya bitişik papilladaki skar oluşumundan kaynaklanır (24). Bu durum böbreğin büyük kısmını İRR'ye maruz bırakır, İYE tekrarlırsa, piyelonefrit ve ilerleyici böbrek skarı oluşma riskini arttırır. Bunun aksine, reflü bulunmayan papillalar ile tamamen dolu olan böbrekler, İYE ve VUR olsa bile, böbrekte skar oluşumundan korunabilir (31,32).

Sonuç olarak, reflüye bağlı gelişen renal skarın patogenezi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Skar oluşumu için steril İRR tek başına yeterli midir, yoksa olayı başlatmak için enfeksiyon gerekli midir hala tartışmalıdır.

Piyelonefrit sonrası renal skar oluşumu enfeksiyonu takip eden inflamatuvar cevaba bağlıdır (81). Hayvan deneylerinde akut piyelonefritte kolşisin ile PMNL hareketini inhibe etmekle inflamasyonda azalma ve bakteri sayısında artış gözlenmiştir. İlginç olarak bu hayvanlarda bakteri sayısında artışa rağmen renal skarda azalma gözlenmiştir. Bu bulgu renal skarın bakteriyel invazyondan ziyade lökosit infiltrasyonuna bağlı olduğunu desteklemektedir (82). Deneysel piyelonefrit modellerinde erken antibiyotik tedavisiyle böbrekte aktive nötrofillerden salgılanan MPO seviyesinde belirgin düşme, dolayısıyla daha az renal skar geliştiği gösterilmiştir (83). Bu bulgular ışığında enfeksiyonun neden olduğu renal skar patogenezi daha iyi anlayabilmek ve enfeksiyonda renal skar oluşumunu önleyebilmek amacı ile bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Renal skar oluşumunda oksidatif stresin rolünü destekleyecek nitelikte, ratlarda oluşturulan deneysel piyelonefrit modellerinde, melatoninin MDA seviyesini azaltarak renal skar oluşumundan koruduğu gösterilmiştir (84). Matsumoto ve ark (85) ratlarda yaptığı çalışmada süperoksit üretimindeki artışın renal skar ile ilişkili olduğunu ve bu ratların süperoksit dismutaz ile tedavi edilmesi ile renal skar oluşumunun önlenilebileceğini göstermişlerdir. Son zamanlarda benzer şekilde Sadeghi ve ark (86) ratlarda vitamin E ve allopurinol tedavisinin piyelonefritte renal skar oluşumunu önlediğini tespit etmişlerdir. Tüm bu bilgiler oksidatif stresin renal skar oluşumunda rol aldığını ve antioksidan ilaçlarla renal skar sıklığının azaltılabileceğini desteklemektedir.

İnflamatuvar ve metabolik hastalıklar, toksinlere maruziyet, iskemi-reperfüzyon hasarı, karsinogenez, yaşlanma ve ateroskleroz gibi olayların patogenezinde oksidan hasarın rol aldığı bilinmektedir (87). Oksidan hasar aktif nötrofiller, monositler ve mezengial hücreler tarafından üretilen serbest radikaller ve SOR tarafından başlatılmaktadır. Hücreler ya da organlar oksidan strese maruz kaldığı zaman birçok antioksidan defans mekanizması devreye girerek oksidan hasarı sınırlandırmaya çalışır. Isı, travma, enfeksiyon, radyasyon, toksinler, iskemi gibi uyaranlarla ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri; 1- SOR üreten enzimleri (ksantin oksidaz vs) ve/veya ürünlerini (hipoksantin vs) arttırarak, 2-fagositleri aktive ederek, 3-fosfolipaz, siklooksijenaz ve lipooksijenazı aktive ederek, 4- antioksidanları yok ederek, 5- serbest metal iyonlarını salgılatarak, 6- hem proteinlerini salgılatarak, 7- elektron transport zincirini bozarak, doku hasarına neden olmaktadır. Sonuçta

proteinler, membranlar, DNA ve bazal membranda oksidan ilişkili değişiklikler hücre ve organ disfonksiyonuna neden olur (48). Glomerülonefrit, vaskulitler, toksik nefropatiler, piyelonefrit, akut böbrek yetmezliği gibi birçok renal hastalıkların en azından bir döneminde oksidan hasar rol almaktadır (6).

Bu çalışmada VUR grubunda plazma MPO aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı yüksek bulundu. Nötrofillere spesifik bir enzim olan MPO'nun plazmada yüksek düzeyde bulunması, primer VUR'da oksidatif hasar oluşturabilen aktif nötrofillerin ve monositlerin varlığını yansıtabileceği düşünüldü. Nitekim domuzlarda ve tavşanlarda oluşturulan deneysel steril reflü modellerinde histolojik olarak böbreklerde skar dokusu olmasa bile interstisyel mononükleer hücre infiltrasyonu olduğu gösterilmiştir (88-91). Çalışmamızda örnek alındığı dönemde idrar kültürlerinin steril olması nedeniyle nötrofil ve monositleri aktive edecek enfeksiyon varlığı dışlanmıştır. Dolayısıyla tespit edilen artmış MPO düzeylerinin VUR'da reflüye bağlı oluşan interstisyel mononükleer hücre artışı ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Aktive nötrofillerin ve monositlerin solunumsal patlama ile çok geniş bir SOR oluşturma yeteneği vardır. SOR oluşumu NADPH oksidaz kompleksinin aktivasyonu ile başlar. Ve hızla süperoksid anyonu, hidrojen peroksid, tek oksijen ve hidroksil radikalleri oluşur. H_2O_2 plazma membranından geçer ve hücre içi demir ile reaksiyona girerek Haber-Weiss döngüsü ile hidroksil radikalleri oluşur. Hidroksil radikalleri membran lipidlerinin peroksidasyonunu, protein agregasyonunu ve DNA hasarını tetikler. Aktif nötrofillerden $O_2\cdot$ ve H_2O_2 gibi SOR türevleri ile birlikte MPO da plazmaya salınmaktadır. MPO, klorid varlığında kloridli oksidanlar oluşturur ve H_2O_2 hipoklorik aside dönüşür. HOCl'nin hedef organları membran proteinleri ve bu proteinlerin tiyol gruplarıdır. Sonuçta protein ve amino asitlerin serbest fonksiyonel grupları özellikle de serbest tiyol gruplarında oksidatif modifikasyona neden olurlar ve bu da doku hasarını ortaya çıkarır (7,48,92).

Artmış MPO aktivitesiyle ortaya çıkan SOR yerine, oksidatif stresin hücre ve dokulardaki etkisi sonucu oluşan lipid hidroperoksit, AOPP ve pirrolize protein düzeyleri primer VUR olan çocuklarda çalışıldı. VUR grubunda plazma AOPP, lipid

hidroperoksit ve serum pirrolize protein düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiki olarak yüksek bulundu.

Proteinler oksidan ilişkili hasarın hedef maddelerinden biridir (50). Proteinlerin oksidatif hasar ile biyokimyasal ve yapısal özelliklerinin modifikasyona uğraması, proteinlerin enzimatik, metabolik ve immünolojik özelliklerinin kaybına neden olur (50). AOPP, myeloperoksidaz sistemi tarafından oksidatif hasar sonucu oluşan modifiye proteinlerin genel bir adıdır. Son dönemlerde AOPP üremik toksin olarak kabul görmektedir. Plazma AOPP düzeyleri KBY'de yükselmekte ve üreminin progresyonu ile artış göstermektedir (56). AOPP, monosit ve nötrofillerde solunumsal patlamayı tetikler. Üremik plazmadan elde edilen AOPP, normal nötrofillerde solunumsal patlamayı tetiklemektedir. AOPP stimülasyonundan 12 saat sonra belirgin interlökin-8 salınımı olmaktadır. Ayrıca monositlerde tümör nekrozis faktör alfa salınımı artmaktadır (56).

Literatür gözden geçirildiğinde, VUR'da AOPP düzeyleri ile ilgili çalışma tespit edilemedi. Çalışma grubundaki hastaların hepsinde böbrek fonksiyonları normal olduğu için (kan üre azotu, serum kreatin, idrar dansitesi) VUR grubundaki plazma AOPP düzeylerindeki yüksekliğin, primer olarak VUR'a bağlı olabileceği düşünüldü. Aktif nötrofillerden salgılanan MPO ile ortama çıkan HOCl proteinlerle reaksiyona girerek AOPP oluşmaktadır. Organizmada HOCl sadece MPO ile oluşmaktadır. Dolayısıyla çalışmamızda AOPP düzeylerinin yüksek tespit edilmesi artmış MPO düzeylerini desteklemektedir.

Proteinlerin serbest amino gruplarıyla lipit peroksidasyon ürünlerinin reaksiyonu sonucu yaygın şekilde oluşan pirrolize proteinler, organizmanın maruz kaldığı oksidatif stresin gösterilmesinde bir belirteç olarak kullanılabilmektedir. Behçet, Alzhemier ve Parkinson hastalığında (60,93) seviyeleri yüksek saptanmış olmasına rağmen literatürde VUR ile pirrolize proteinlerin ilişkisini gösteren bir çalışma bulunamadı. Pirrolize protein düzeylerindeki yüksekliğin, primer olarak VUR'a bağlı olabileceği düşünüldü.

Lipid hidroperoksit ürünlerinin oluşumu doymamış yağ asidi gruplarının peroksil radikali bağımlı zincir reaksiyonları sonucu ortaya çıkar. Hidroperoksitler dengesizdirler ve akrolein, 4-hidroksinonenal (HNE) ve malondialdehit (MDA) veya tiyobarbitürik asit-reaktif maddeler (TBARS) olarak adlandırılan aldehitler gibi daha küçük kararlı bileşiklere parçalanırlar. Daha önceleri oksidatif stresin göstergesi olarak MDA, HNE gibi lipid hidroperoksit metabolitlerine bakılsa da bu bileşiklerin yarılanma ömürlerinin kısa olması nedeniyle son dönemde lipid hidroperoksit düzeylerinin oksidatif stresi daha iyi yansıttığı düşünüldüğü için (51,52) çalışmamızda serum lipid hidroperoksit düzeyleri çalışılmıştır. Çalışmada plazma lipid hidroperoksit düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek tespit edildi.

Bu bulgular primer VUR'da nötrofillerin aktive olduğunu ve ortama MPO çıktığını, MPO'nun etkisiyle membran lipidlerinin peroksil radikali ile oluşturduğu bir dizi reaksiyon sonucu lipid hidroperoksit oluştuğunu ve lipid peroksidasyon ürünlerinin proteinlerin serbest amino gruplarıyla reaksiyona girmesi sonucu AOPP ve pirrolize protein oluştuğunu desteklemektedir.

Literatür gözden geçirildiğinde hem enfekte hem de steril VUR'da lipid hidroperoksitlerin metaboliti olan MDA'nın yüksek bulunduğunu gösteren az sayıda çalışmalar mevcuttur. Han ve ark. (88) tavşanlarda yaptığı çalışmada hem steril VUR grubunda hem de enfekte VUR grubunda böbrek dokusunda MDA seviyelerini kontrol grubuna göre istatistiki olarak yüksek bulmuştur. Ülkemizden yapılan bir çalışmada, Biçer ve ark (89) tavşanlarda steril VUR oluşturmuş ve bu grupta böbrek MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır. Üniversitemizde yapılan deneysel bir çalışmada Okur ve ark (90) tavşanlarda enfekte VUR'da renal dokuda MDA seviyelerini yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmalardaki sonuçlar hayvan deneylerinde ve böbrek dokusunda elde edilmiş olmalarına ve lipid hidroperoksitin yıkım ürünleri çalışılmasına rağmen çalışmamızdaki sonuçlarla uyumlu olarak değerlendirildi.

Tiyol grupları, antioksidan sistemde bulunan ve SOR ve diğer serbest radikallerin (enzimatik veya nonenzimatik yollarla) tahrip edildiğini gösteren önemli bir grup antioksidandır (55). Plazma serbest tiyol grupları albuminin yapısında bulunur ve

plazma antioksidan sistemlerinin en önemlisini oluşturur. HOCl toksisitesinin çok güçlü olması nedeniyle protein ve aminoasitlerin serbest fonksiyonel gruplarında (özellikle serbest tiyol gruplarında) oksidatif modifikasyona neden olmakta ve oksidatif strese bağlı doku hasarını ortaya çıkarmakta kullanılmaktadır. Daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi oksidatif stresin arttığı durumlarda oksidatif stres ve oksidanlara karşı tiyol tüketimindeki artışa bağlı olarak plazma serbest tiyol düzeylerinin azaldığı saptanmıştır (54,94). Çalışmamızda plazma serbest tiyol düzeyleri VUR grubunda kontrol grubuna göre daha düşük olmasına karşın istatistiki olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi. Ancak bu durumun artmış MPO aktivitesi ve plazma AOPP, serum pirrolize protein ve plazma lipid hidroperoksit seviyelerindeki artışa karşılık tiyol tüketimindeki artışa bağlı olabileceği düşünüldü.

Han ve ark (88) tavşanlarda enfekte VUR oluşturmuş ve I. grup tedavisiz izlanmış, II. gruba melatonin ve III. gruba crannberry (kızılcık benzeri bitki) tedavisi vermişlerdir. Melatonin ve crannberry alan grupta almayanlara göre böbrek MDA seviyelerinin daha düşük olduğunu ve bu grupta histolojik olarak renal skar oluşmadığını göstermişlerdir. Benzer bir çalışma üniversitemizde yapılmış ve enfekte VUR oluşturulan tavşanların bir kısmına sadece antibiyotik ve bir kısmına da antibiyotik ve vitamin E tedavisi verilmiştir. Vitamin E ve antibiyotik tedavisi alan grupta böbrek MDA seviyeleri sadece antibiotik tedavisi alan gruba göre daha düşük ve renal skar oluşma oranının daha az olduğu gözlemlenmiştir (95). Benzer şekilde Biçer ve ark (89) steril VUR oluşturduğu tavşanlarda melatonin tedavisi ile renal skar oluşumunun önlendiğini ve bu tavşanlarda doku MDA seviyesinin daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular VUR’da antioksidan tedavinin renal skar oluşumunu engelleyebileceğini desteklemektedir. İlaveten VUR’da oksidatif stresin arttığını ve antioksidan sistemlerin azaldığını desteklemektedir ki, bu bulgular çalışmamızdaki artmış oksidatif stres belirteçleri ve azalmış tiyol seviyeleri ile uyumlu olarak değerlendirildi.

Hastaları skarlı ve skarsız olarak 2 gruba ayırdığımız zaman, bu iki grup arasında plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP düzeyi, plazma lipid hidroperoksit düzeyi, serum pirrolize protein düzeyi ve plazma serbest tiyol düzeyleri arasında istatistiki bir farklılık saptanmadı. Hem skar (+) hem de skar (-) grupta plazma MPO aktivitesi,

AOPP, lipid hidroperoksit ve serum pirrolize protein düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek tespit edildi.

Bu çalışma kesitsel bir çalışma olup belli bir zaman diliminde primer VUR tespit edilen hastalar çalışmaya alındı. Skarlı olan hastalarda skar dokusunun ne zaman oluştuğu bilinmemektedir. Hastaların yaş ortalamasının 6.4 ± 3.8 yıl olduğu ve skar dokusunun en sık ilk 2 yaşta oluştuğu göz önüne alındığında, skar dokusunun çok önceleri oluşmuş olduğu düşünülebilir. Skar dokusu fibrotik bir doku olduğu için bu dokudan oksidatif stres belirteçlerini yükseltecek reaksiyonların oluşamayacağı düşünüldü. Çalışma esnasında idrar kültürlerinin steril olması nedeniyle oksidatif stres belirteçlerini yükseltebilecek enflamasyonun etkisi dışlanmıştır. Dolayısıyla skarlı ve skarsız gruplar arasında oksidatif stres belirteçleri açısından fark olmaması, oksidatif stres belirteçlerindeki artışın doğrudan VUR'un etkisine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Bu durumun skarsız VUR'lu hastalarda skar gelişimi ya da skarlı VUR'lu hastalarda yeni skar oluşumu açısından risk oluşturabileceğini, dolayısıyla hastaların izlenmesi gerektiğini düşündürmüştür.

Reflü derecesine göre hafif, orta ve ağır VUR grupları arasında plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP düzeyi, plazma lipid hidroperoksit düzeyi, serum pirrolize protein düzeyi ve plazma serbest tiyol düzeyleri arasında istatistiki bir farklılık saptanmadı. Her 3 reflü grubunda da plazma MPO aktivitesi, plazma AOPP, serum lipid hidroperoksit ve serum pirrolize protein düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek tespit edildi. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda VUR derecesi ile renal skar arasında herhangi bir ilişki olmadığı ve devamlı antibiotik tedavisinin bu hastalarda piyelonefrit tekrarlama oranlarına ve renal skar gelişme insidansına herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Renal parankimal skarın reflü derecesinden çok intrarenal reflü miktarı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (96,97). Hafif, orta ve ağır reflü gruplarında oksidatif stres belirteçleri arasında fark olmaması, oksidatif stres belirteçlerindeki artışın reflü derecesinden bağımsız olarak doğrudan VUR'a bağlı olduğunu desteklemekte ve bu da skarın reflü derecesine bağlı olmadığını gösteren çalışmaları destekleyen bulgu olarak yorumlandı.

Primer VUR'u olan ve skarı olmayan grupta oksidatif stres belirteçleri nasıl renal skar olan grup kadar yüksek olabilir? Reflü ile ilgili oluşan yapısal ve fonksiyonel

değişiklikler günümüzde halen tam olarak bilinmemektedir. Normalde sıfır olan pelvis içi basıncı, VUR nedeniyle mesaneden yansıyan basınç ile artar ve yüksek basınçlı reflüde mesane içi basınç ile pelvis içi basınç eşitlenir. Artan basıncın intrarenal reflü yoluyla böbrek papillalarından böbrek parankimine ulaşmasının skar oluşumunu başlattığı düşünülmektedir (91). Hodson ve ark (30) mesane çıkış yolu obstruksiyonu oluşturarak artmış mesane içi basıncın böbreğe yansması ile renal skar oluşabileceğini göstermişlerdir. Baek ve ark (98) tavşanlarda yaptığı normal mesane basınçlı VUR modelinde mesane dolumu arttıkça renal pelvis basıncının arttığını bildirmişlerdir. Tavşanlarda yapılan üç farklı çalışmada steril VUR oluşturulan gruplarda histolojik olarak skar olmasa bile interstisyel mononükleer hücre infiltrasyonu olduğu gösterilmiştir (88-90). Zhang ve arkadaşları (99) koyunlarda normal basınçlı steril reflü oluşturmuş ve histolojik inceleme sonunda distal tübüllerde dilatasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Son zamanlarda Paltiel ve ark (91) yaptığı çalışmada, domuzlarda düşük basınçlı steril reflünün bile, daha önce normal olan böbreklerde ılımlı-fokal kronik interstisyel inflamasyona sebep olduğunu ve 1 yıl içinde takipte bu interstisyel inflamasyon alanlarında fibrozis geliştirdiğini göstermiştir. Bu durumun intrarenal reflü varlığına ya da mesaneden yansıyan basıncın toplayıcı kanalda yaptığı basınç artışına bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Fonksiyonel olarak VUR'a bağlı renal değişimler incelendiğinde, Greenfield ve ark (100) domuzlarda yaptığı çalışmada reflü olan böbrekte normal böbreğe göre total kan akımında değişim oluşmaksızın üst ve alt renal korteks kan akımında azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Tüm bu bulgular ışığında primer VUR'da skar dokusundan ve reflü derecesinden bağımsız olarak doğrudan reflünün etkisiyle (intrarenal reflü ve/veya toplayıcı kanallardaki artan basınç ve/veya renal kortikal kan akımındaki değişiklikler) renal parankimal hücrelerin ve tübül epitel hücrelerin etkilenecek fagositlerin aktive olabileceği ve sonuçta oksidatif stresle doku hasarının oluşabileceği ve bu durumun kronik olarak devam etmesinin fonksiyonel ve yapısal renal hasar oluşumuna neden olabileceği şeklinde yorumlandı. Dolayısıyla VUR'lu hastaların reflü derecesine ve renal skar varlığına bakılmaksızın takip edilmeleri gerektiğini düşünmekteyiz.

Primer VUR'da oksidatif stresin renal skar oluşumundaki rolü ve antioksidan tedavinin etkilerini incelemek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

Primer VUR'u olan 44 çocuk hastada oksidatif stres belirteçlerinden MPO aktivitesi, AOPP, pirrolize protein, lipid hidroperoksit ve tiyol seviyelerini incelediğimiz bu çalışmada aşağıdaki sonuçlara ulaşıldı:

- 1- Hasta grubunda oksidatif stres belirteçlerinin yüksek olması nedeni ile primer VUR'da oksidatif stresin doğrudan VUR'un etkisiyle artmış olabileceği düşünüldü.
- 2- Hasta grubunda tiyol düzeylerinin düşük olması oksidatif stresdeki artışa bağlı olarak tiyol kullanımının artmasına bağlı olduğu düşünüldü.
- 3- Skarlı ve skarsız gruplar arasında oksidatif stres belirteçleri arasında farklılık olmaması, skar dokusu oluşuktan sonra oksidatif stresde ilave yükselme olmayacağı şeklinde yorumlandı.
- 4- Hafif, orta ve ağır reflü derecelerinde oksidatif stres belirteçleri arasında farklılık olmaması, oksidatif stresin reflü derecesinden bağımsız olarak her reflü derecesinde oluşabildiği şeklinde yorumlandı.

7. KAYNAKLAR

1. Rushton HG. Vesicoureteral reflux and scarring In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P (eds), Pediatric Nephrology (5th ed). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004, pp1027-1048.
2. Elder JS. Vesicoureteral reflux. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds), Nelson Textbook of Pediatrics (18th ed). Philadelphia: WB Saunders, 2008, pp2228-2234.
3. Söylemezoğlu O. Vezikoureteral reflü. Hasanoğlu E, Düşünsel R, Bideci A. (eds), Temel Pediatri. Ankara: Güneş Tıp Kitapevi, 2009, s931-935.
4. Sargent MA. What is the normal prevalence of vesicoureteral reflux? *Pediatr Radiol* 2000; 30: 587-593.
5. Brakeman P. Vesicoureteral reflux, reflux nephropathy, and end-stage renal disease. *Adv Urol* 2008; 508949: 1-7.
6. Andreoli SP. Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. *Pediatr Nephrol* 1991; 5: 733-742.
7. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006; 141: 312-322.
8. Williams G, Fletcher JT, Alexander SI, et al. Vesicoureteral reflux. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 847-862.
9. Ataei N, Madani A, Esfahani ST, et al. Screening for vesicoureteral reflux and renal scars in siblings of children with known reflux. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 1127-1131.
10. Hollowel JG, Greenfield SP. Screening siblings for vesicoureteral reflux. *J Urol* 2002; 168: 2138-2141.
11. Noe HN, Wyatt RJ, Peeden JN et al. The transmission of vesicoureteral reflux from parent to child. *J Urol* 1992; 148: 1869.
12. Dillon MJ, Goonasekera CDA. Reflux Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2377-2383.
13. Decter RM. Update on vesicoureteral reflux: Pathogenesis, Nephropathy and management. *Rev Urol* 2001; 3: 172-178.
14. International Reflux Study Committee. Medical versus surgical treatment of primary vesicoureteral reflux. *Pediatrics* 1981; 67: 392-400.

15. Stefanidis CJ, Siomou E. Imaging strategies for vesicoureteral reflux. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 937-947.
16. Lim R. Vesicoureteral reflux and urinary tract infection: evolving practices and current controversies in pediatric imaging. *AJR* 2009; 192: 1197-1208.
17. Arant B. Vesicoureteral reflux and evidence-based management. *J Pediatr* 2001; 139: 620-621.
18. Jodal U, Smelie JM, Lax H. et al. Ten-year results of randomized treatment of children with severe vesicoureteral reflux: final report of the international reflux study in children. *Pediatr Nephrol* 2006;21: 785-792.
19. Acar C, Gurocak S. Vezikoiüreteral reflüde güncel yaklaşımlar ve tedavi alternatifleri. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2010; 19: 38-46.
20. Cendron M. Reflux nephropathy. *J Pediatr Urol* 2008; 4: 414-421.
21. Solari V, Unemoto K, Piotrowska AP et al. Increased expression of mast cells in reflux nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 157-163.
22. Morita M, Yoshiara S, White RH et al. The glomerular changes in children with reflux nephropathy. *J Pathol* 1990; 162: 245-253.
23. Bailey RR. The relationship of vesicoureteral reflux to urinary tract infection in chronic pyelonephritis: reflux nephropathy. *Clin Nephrol* 1973; 1: 132-141.
24. Rushton HG. The evaluation of acute pyelonephritis and renal scarring with technetium 99m-dimercaptosuccinic acid renal scintigraphy: evolving concepts and future directions. *Pediatr Nephrol* 1997; 11: 108-120.
25. Guvel S, Kılınç F, Kayaselçuk F et al. Sterile vesicoureteral reflux decreases tubular cell apoptosis in rat kidney. *Urology* 2005; 5: 1244-1248.
26. Johnson RJ. The glomerular response to injury: progression or resolution? *Kidney Int* 1994; 45: 1769-1782.
27. Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y et al. Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Am J Pathol* 2001; 159: 1313-1321.
28. Mackie GG, Stephens FD. Duplex kidneys: a correlation of renal dysplasia with position of the ureteral orifice. *J Urol* 1975; 114: 274-280.
29. Sommer JT, Stephens SD. Morphogenesis of nephropathy with partial ureteral obstruction and vesicoureteral reflux. *J Urol* 1981; 125: 67-72.

30. Hodson CJ, Maling TM, McManamon PJ et al. The pathogenesis of reflux nephropathy (chronic atrophic pyelonephritis). *Br J Radiol* 1975; Suppl3: 1-26.
31. Ransley PG, Risdon RA. Renal papillary morphology and intrarenal reflux in the young pig. *Urol Res* 1975; 3: 105-109.
32. Ransley PG, Risdon RA. Renal papillary morphology in infants and young children. *Urol Res* 1975; 3: 111-113.
33. Ransley PG, Risdon RA, Godley ML. High pressure sterile vesicoureteral reflux and renal scarring: an experimental study of the pig and mini-pig. *Contrib Nephrol* 1984; 39: 320-343
34. Robert JA, Dominique GJ, Martin LN et al. Immunology of pyelonephritis in the primate model: live versus heat-killed bacteria. *Kidney Int* 1981;19: 297-305.
35. Robert JA, Roth JK, Dominique GJ et al. Immunology of pyelonephritis in the primate model: V. Effect of superoxide dismutase. *J Urol* 1982; 128: 1394-1400
36. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163.
37. Goonasekera CD, Shah V, Wade AM et al. 15-year follow-up of renin and blood pressure in reflux nephropathy. *Lancet* 1996; 347: 640-643.
38. Jacobson SH, Eklöf O, Eriksson CG et al. Development of hypertension and uremia after pyelonephritis in childhood: 27-year follow-up. *Br Med J* 1989; 299: 703-706.
39. Kohler J, Tencer J, Thysell H, et al. Vur diagnosed in adulthood. Incidence of uriner tract infections, hypertension, proteinuria, back pain and renal calculi. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12; 2580-2587.
40. The North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies. NAPRTCS 2006 Annual Report. Available at: emmes.com/study/ped/annlrept/annlrept2006.pdf.
41. Broyer M, Donckerwolcke RA, Brunner FP, et al. Combined report on regular dialysis and transplantation of children in Europe. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 1981;18: 60-87.
42. Ardissino G, Avolio L, Dacco V, et al. Long-term outcome of VUR associated chronic renal failure in children. Data from the ItalKid Project. *J Urol* 2004; 172: 305-311.

43. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142: 231-255.
44. Morena M, Martin-Mateo M, Cristol JP, et al. Rationale for antioxidant supplementation in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2001; 12: 312-324.
45. Zachara BA, Gromadzińska J, Wasowicz W, et al. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta Biochim Pol* 2006; 53: 663-677.
46. Shah SV, Baliga R, Rajapurkar M, et al. Oxidants in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 16-28.
47. Descamps-Latscha B, Drüeke T, Witko-Sarsat V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial* 2001; 14: 193-199.
48. Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 10: 5-12.
49. Cross CE, van der Vliet A, O'Neill CA, et al. Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 10: 185-191.
50. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001; 59 suppl 78: 108-113.
51. Iacobini C, Menini S, Ricci C, et al. Advanced lipoxidation end-products mediate lipid-induced glomerular injury: role of receptor-mediated mechanisms. *J Pathol* 2009; 218: 360-369.
52. Berg TJ, Nourooz-Zadeh J, Wolff SP, et al. Hydroperoxides in plasma are reduced by intensified insulin treatment. A randomized controlled study of IDDM patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* 1998; 21: 1295-1300.
53. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Ling KL, et al. Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochem J* 1996; 313: 781-786.
54. Yazici C, Köse K, Calis M, et al. Protein oxidation status in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2004; 43: 1235-1239.

55. Baskol G, Demir H, Baskol M, et al. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 2006; 24: 307-311.
56. Witko-Sarsat V, Gausson V, Descamps-Latscha B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int* 2003; 63 Suppl.84: 11-14.
57. Witko-Sarsat V, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products: novel uraemic toxins and pro-inflammatory mediators in chronic renal failure? *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1310-1312.
58. Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58: 2571-2578.
59. Hidalgo FJ, Alaiz M, Zamora R. A spectrophotometric method for the determination of proteins damaged by oxidized lipids. *Anal Biochem* 1998; 262: 129-136.
60. Kaya S, Köse K, Yazıcı C ve ark. Pirrolize protein Behçet Hastalığında yeni bir oksidatif stres belirteci olabilir mi? *Erciyes Tıp Dergisi* 2010; 32:1-4.
61. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* 1998; 92: 3007-3017.
62. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 598-625.
63. Rodrigo R, Rivera G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 409-422.
64. Linares V, Alonso V, Albina ML et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in kidney and liver of rats treated with sulfasalazine. *Toxicology* 2009; 256: 152-156.
65. Deiana M, Incani A, Rosa A, et al. Protective effect of hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol on H₂O₂ induced lipid peroxidation in renal tubular epithelial cells. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 2984-2990.
66. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: 861-875.
67. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 206-269.

68. Nourooz-Zadeh J. Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. *Methods Enzymol* 1999;300:58-62
69. Martinez-Cruz F, Guerrero JM, Osuna C. Melatonin prevents the formation of pyrrolized proteins in human plasma induced by hydrogen peroxide. *Neurosci Lett* 2002; 326: 147-50.
70. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative damages in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-1313.
71. Hu ML, Louie S, Cross CE, et al. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 1993; 121: 257-262.
72. Hodson CJ, Edwards D. Chronic pyelonephritis and vesicoureteral reflux. *Clin Radiol* 1960; 11: 219-231.
73. Caione P, Ciofetta G, Collura G et al. Renal damage in vesico-ureteric reflux. *BJU Int* 2004; 93: 591-595.
74. Lee JH, Son CH, Lee MS et al. Vesicoureteral reflux increases the risk of renal scars: a study of unilateral reflux. *Pediatr Nephrol* 2006; 21: 1281-1284.
75. Soylu A, Demir BK, Türkmen M et al. Predictors of renal scar in children with urinary infection and vesicoureteral reflux. *Pediatr Nephrol* 2008; 23: 2227-2232.
76. Silva JMP, Diniz JSS, Oliveira EA et al. Features of primary vesicoureteral reflux and renal damage in children at a single institution in Brazil from 1969 to 1999. *Int Urol Nephrol* 2003; 35: 161-168.
77. Olbing H, Claesson I, Ebel KD, et al. Renal scars and parenchymal thinning in children with VUR: a 5-year report of the International Reflux Study in Children (European Branch). *J Urol* 1992;148:1653-1656.
78. Smellie JM, Ransley PG, Normand ICS et al. Development of new renal scars: a collaborative study. *BMJ* 1985; 290: 1957-1960.
79. Funston MR, Cremin BJ. Intrarenal reflux: papillary morphology and pressure relationships in children's necropsy kidneys. *Br J Radiol* 1978; 51: 665-670.
80. Jakobsson B, Berg U, Svensson L. Renal scarring after acute pyelonephritis. *Arch Dis Child* 1994; 70: 111-115.

81. Glauser MP, Lyons JM, Braude AI. Prevention of chronic experimental pyelonephritis by suppression of acute suppuration. *J Clin Invest* 1978; 61: 403-407.
82. Bille J, Glauser MP. Protection against chronic pyelonephritis in rats by suppression of acute suppuration: effect of colchicine and neutropenia. *J Infect Dis* 1982; 146: 220-226.
83. Meylan PR, Markert M, Bille J et al. Relationship between neutrophil mediated oxidative injury during acute experimental pyelonephritis and chronic renal scarring. *Infection and Immunity* 1989; 57: 2196-2202.
84. Imamoğlu M, Cay A, Cobanoğlu U, et al. Effects of melatonin on suppression of renal scarring in experimental model of pyelonephritis. *Urology* 2006; 67: 1315-1319.
85. Matsumoto T, Mizunoe Y, Ogata N. Role of superoxide in renal scarring following infection by mannose-sensitive piliated bacteria. *Urol Res* 1991; 19: 229-233.
86. Sadeghi Z, Kajbafzadeh AM, Tajik P et al. Vitamin E administration at the onset of fever prevents renal scarring in acute pyelonephritis. *Pediatr Nephrol* 2008; 23: 1503–1510.
87. Paller MS, Holdal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984; 74: 1156-1164.
88. Han CH, Kim SH, Kang SH et al. Protective effects of cranberries on infection –induced oxidative renal damage in a rabbit model of vesico-ureteric reflux. *BJU Int* 2007; 100: 1172-1175.
89. Biçer Ş, Yurtçu M, Köylü Ö ve ark. Vezikoüreteral reflüde reflü nefropatisine melatoninin etkisi. *Genel Tıp Dergisi* 2009; 19: 161-167.
90. Okur H, Köse O, Kula M et al. The role of infection and free oxygen radical damage in reflux nephropathy: an experimental study. *J Urol* 2003; 169: 1874-1877.
91. Paltiel HJ, Mulkern RV, Perez-Atayde A et al. Effect of chronic, low pressure, sterile vesicoureteral reflux on renal growth and function in a porcine model: A radiologic and pathologic study. *Radiology* 2000; 217:507–515.
92. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987; 1: 358-364.

93. Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, et al. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1997; 68: 2092-2097.
94. Yazici C, Kose K, Calis M, et al. Increased advanced oxidation protein products in Behcet's disease: a new activity marker? *Br J Dermatol* 2004; 151:105-111.
95. Gözükcük A. Deneysel vezikoüreteral reflüde oluşan böbrek hasarına E vitamininin etkisi. Uzmanlık tezi, Kayseri, 2004.
96. Penesi M, Travan L, Peratoner L, et al. Preventing pyelonephritis and renal scars? Is antibiotic prophylaxis in children with vesicoureteral reflux effective in a randomized controlled trial. *Pediatrics* 2008; 121: e1489-1494.
97. Doganis D, Siafas K, Mavrikou M, et al. Does Early Treatment of Urinary Tract Infection Prevent Renal Damage? *Pediatrics* 2007; 120: e922-928.
98. Baek M, Paick SH, Jeong SJ et al. Urodynamic and histological changes in a sterile rabbit vesicoureteral reflux model. *J Korean Med Sci* 2010; 25: 1352-1358.
99. Zhang YY, Bailey RR. A model of sterile vesicoureteric reflux in the sheep. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 190-196.
100. Greenfield SP, Lewis W, Perry B et al. Regional renal blood flow measurements using radioactive microspheres in achronic porcine model with unilateral vesicoureteral reflux. *J Urol* 1995; 154: 816-819.

EK TABLOLAR

Ek tablo 1: Hasta grubunun demografik özellikleri

İsim	Dosya No	Cinsiyet	Yaş (yıl)	skar	Reflü grade Sağ/sol
KK	1319588	K	6	+	3/2
Sİ	1496927	K	9	+	0/3
ÖÇ	1342396	E	7,5	-	3/2
RA	1408707	K	10,66	+	0/3
YD	1597295	K	8	+	0/3
BT	1207636	K	8	-	1/3
TG	1362963	K	5	+	0/3
HT	1569374	K	8,75	+	3/0
EY	1712594	K	17	-	3/0
GET	1499820	K	8	+	0/4
HS	1767909	K	10,5	+	3/0
HS	1791543	E	2,25	-	2/2
SŞ	1356112	K	7	+	5/5
AEÖ	1760218	E	0,5	-	4/0
SK	1412320	K	13	+	3/3
EE	1702820	E	0,2	+	5/0
SA	1731944	E	0,75	+	2/3
ZY	1767815	K	7	+	1/3
CY	1711643	K	12,5	+	3/3
MT	1750815	K	6	+	0/2
EO	1355203	K	12,5	+	0/3
SK	1709944	K	6	+	3/4
EB	1763008	K	2,5	+	3/3
GÇB	1242144	K	14,75	+	3/0
ATC	1796502	E	0,33	+	4/1
GNŞ	1596282	K	9,5	-	0/2
MŞ	1783938	K	3,75	+	3/3
EAC	1701457	E	0,75	+	4/4
AŞ	1780121	E	7,25	+	0/5
RKŞ	1803166	K	4,75	+	0/3
EK	1408760	K	8,66	+	0/2
Bİ	1799004	K	4	+	5/3
ŞK	1798170	K	8,75	-	0/3
MNC	1765159	K	2	-	0/3
BK	1405315	K	5,33	+	4/4
MA	1356188	K	10,33	+	0/1
MZC	1495489	K	13,75	+	4/4
EA	1590199	E	3,75	-	3/3
CEY	1544273	E	5,25	+	0/3
MD	1793615	K	3,66	+	2/1
RD	1788525	K	7	-	0/3
EŞ	1710236	K	5,66	+	3/1
YFS	1813661	E	4,5	-	3/2
AE	1754437	K	2,5	-	3/3

Ek tablo 2: Hasta grubunun MPO, AOPP, lipit hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol düzeyleri

İsim	MPO (Ü/L)	AOPP (kloramin µmol/L)	LHP (µmol/L)	PP (nmol/mg protein)	Tiyol (µmol/L)
KK	97,4018	56,8852459	36,6076	0,900827519	336,429
Sİ	81,7432	41,3114754	47,4352	0,862614986	396,429
ÖÇ	90,8995	66,2404372	14,6946	0,8385835	215
RA	80,947	79,5628415	48,7242	0,717685165	260,714
YD	73,7812	85,4863388	42,537	0,937836049	369,286
BT	69,88867		22,6864	0,622232002	187,857
TG	100,852		42,0214	0,70128491	366,429
HT	100,5866	112,590164	34,803	1,191998684	326,429
EY	83,8664		59,8096	0,740619926	379,286
GET	117,8818	96,9617486	36,3498	1,181699582	335
HS	113,6797	59,3661202	40,4746	1,238217036	357,857
HS	98,64033	46,4043716	45,115	1,310408367	383,571
SŞ	77,6295	59,7923497	39,4434	0,944839416	352,143
AEÖ	70,10983	52,1530055	39,959	0,778874582	355
SK	61,26317	63,1912568	32,4828	0,80462122	313,571
EE	61,3074	38,3715847	18,8194	1,057438318	237,857
SA	109,6987	40,0655738	38,9278	1,146475743	349,286
ZY	85,4588	37,0601093	56,2004	0,86784122	445
CY	108,3717	82,295082	25,0066	0,776849431	272,143
MT	122,5263	71,9781421	36,6076	0,875033804	336,429
EO	103,9483	66,5136612	38,4122	1,058537526	346,429
SK	92,00533	45,4863388	31,4516	1,357488462	307,857
EB	107,7082	49,420765	29,9048	1,090064289	299,286
GÇB	109,4775	55,2459016	31,7094	1,280961483	309,286
ATC	103,506	75,3224044	31,7094	1,104118913	309,286
GNŞ	116,3337	65,1584699	29,1314	0,949509077	295
MŞ	116,5548	73,3989071	39,959	0,901783231	355
EAC		73,2786885	52,3334	0,539143427	423,571
AŞ	123,8533	60,4590164	38,4122	0,431007979	346,429
RKŞ	104,1695	67,442623	36,092	0,964715281	333,571
EK	76,74483	42,6885246	37,8966	0,790168491	343,571
Bİ	118,3242	40,5027322	30,6782	0,907001136	303,571
ŞK	109,2563	88,579235	24,2332	0,726497331	267,857
MNC	107,2658	73,2786885	40,2168	0,864556216	356,429
BK	83,601	71,5409836	24,7488	0,642461783	270,714
MA	72,985	67,1147541	49,2398	0,650755414	406,4286
MZC	89,35133	54,1530055	39,7012	0,895870623	353,5714
EA	102,4002	67,8142077	40,4746	1,013148231	357,8571
CEY	106,6023	72,6994536	37,381	0,78232533	340,7143
MD	101,0732	70,4043716	63,6766	0,768602183	400,7143
RD	87,36083	49,8579235	21,913	0,836455885	255
EŞ	117,2183	51,2786885	48,2086	0,905798217	400,7143
YFS	88,2455	39,9453552	47,4352	0,810718666	396,4286
AE	81,6105	66,9071038	39,959	0,724378547	355

Ek tablo 3: Kontrol grubunun demografik özellikleri

İsim	Cinsiyet	Yaş (yıl)
GK	K	6,33
AE	E	0,5
ŞA	K	9,75
FB	K	13,33
EŞ	K	7,5
BNY	K	7,66
HK	K	5
CK	K	3,25
EG	E	3,33
DŞ	K	10,33
GŞ	K	11,33
SK	K	8
ŞG	E	0,75
MB	K	11
GE	K	6
HK	K	3,66
AT	K	2
ŞA	E	6,5

Ek tablo 4: Kontrol grubunun MPO, AOPP, lipid hidroperoksit, pirrolize protein ve tiyol düzeyleri

İsim	MPO (Ü/L)	AOPP (kloramin µmol/L)	LHP (µmol/L)	PP (nmol/mg protein)	Tiyol (µmol/L)
GK	40,6062	39,19125683	28,6158	0,722976997	349,285714
AE	65,023	14,81967213	15,2102	0,609597361	360,714286
ŞA	64,4922	30,83060109	19,8506	0,587186074	315
FB	74,8428	31,59562842	24,2332	1,011006389	410,714286
EŞ	70,8618	30,17486339	20,1084	0,73419165	316,428571
BNY	65,8192	34,87431694	14,179	0,466016947	355
HK	47,5066	17,49726776	19,335	0,786745477	240,714286
CK	48,8336	40,39344262	15,2102	0,750318134	360,714286
EG	44,0564	25,20218579	18,8194	0,450027704	380,714286
DŞ	36,0944	17,22404372	18,046	0,221658424	376,428571
GŞ	51,4876	18,04371585	14,6946	0,530170871	329,285714
SK	57,061	34,27322404	10,0542	0,585006446	332,142857
ŞG	32,1134	23,3442623	14,9524	0,370918854	330,714286
MB	32,3788	31,92349727	27,069	0,44836184	426,428571
GE	57,5918	16,95081967	27,069	0,608391196	426,428571
HK	67,4116	32,41530055	23,9754	0,639167968	462,142857
AT	54,6724	36,40437158	27,5846	0,569360325	309,285714
ŞA	82,8048	33,07103825	17,5304	0,517919479	373,571429

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Seçil KÖSE'ye ait Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Nefroloji Bilim Dalı'nda yapılan “ **Primer vezikoöretal reflüde renal skar oluşumunda oksidatif stresin rolü**” adlı çalışma jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bilim Dalı'nda Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 26.10.2010

Başkan: Prof. Dr. Mustafa Öztürk.....İmza

Üye: Prof. Dr. Ruhan Düşünsel (Danışman).....İmza

Üye: Prof. Dr. Selim Kurtoğlu.....İmza

Üye: Prof Dr. Kazım Üzümlü.....İmza

Üye: Doç. Dr. Musa Karakökçü.....İmza