TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TRANSFORMİNG BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN GELİŞEN EMBRİYONİK ÜRETER ÜZERİNE ETKİSİ: FARELERDE İN-VİTRO MEGAÜRETER MODELİ

Dr. Erdem ÖZTÜRK

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Berk BURGU

Ankara, 2013

KABUL VE ONAY

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: ERDEM ÖZTÜRK	**Tarih:** 28/ 10 / 2013
Anabilim/Bilim Dalı	: ÜROLOJİ	
Tez Danışmanı	: DOÇ. DR. BERK BURGU	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER			
Tezin Başlığı: TRANSFORMİNG BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN GELİŞEN EMBRİYONİK ÜRETER ÜZERİNE ETKİSİ: FARELERDE İN-VİTRO MEGAÜRETER MODELİ			
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi	☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1	☐ 2	☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☒ Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Jüri Başkanı
Unvanı, Adı, Soyadı
Prof. Dr. Mut ŞAFAK
Üroloji ..... Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Unvanı, Adı, Soyadı
Prof. Dr. Kaan Aydos
Üroloji ..... Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Unvanı, Adı, Soyadı
Doç. Dr. Berk BURGU
Üroloji ..... Anabilim/Bilim Dalı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince parçası olmaktan büyük mutluluk ve onur duyduğum Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı ailesinin tüm fertlerine, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, akademik ve insani yönleri ile yol gösterici olup yetişmemde büyük katkıları olan, aynı çatı altında olduğum için kendimi şanlı gördüğüm başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Mut Şafak olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Erol Özdiler, Prof. Dr. Yaşar Bedük, Prof. Dr. Nihat Arıkan, Prof. Dr. Kana Aydos, Prof. Dr. Sümer Baltacı, Prof. Dr. Kadir Türkölmez, Prof. Dr.Önder Yaman, Prof. Dr.Tarkan Soygür, Prof. Dr. Çağatay Göğüs ve Uz. Dr. Eriz Özden'e teşekkürü bir borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim boyunca tüm bilgi ve deneyimlerini bana aktaran, çalışma azmi ve akademik yönü ile örnek olan, tez çalışmama önderlik eden ve tüm aşamalarında desteğini esirgemeyen, yalnız üroloji konusunda değil hayata dair kendisinden çok şey öğrendiğim saygı değer sevgili hocam, tez danışmanım ve ağabeyim Doç. Dr. Berk Burgu'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, her zaman bana destek, cerrahi eğitimimde büyük katkıları bulunan ağabeylerim Yar. Doç. Dr. Ömer Gülpınar, Uz. Dr. Evren Süer ve Uz. Dr. Mehmet İlker Gökçe'ye teşekkür ederim.

Beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum ve güzel günler paylaştığım asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tezimi, bu günlere gelmemde emeği geçen, bana olan inançlarını hiçbir zaman yitirmeyen ve çalışma süresince sıkça zamanlarından çalmak zorunda kaldığım değerli eşim ve sevgili aileme ithaf ediyorum.

Dr. Erdem ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

Sayfa no:

KABUL VE ONAY i
TEŞEKKÜR ii
İÇİNDEKİLER iii
KISALTMALAR v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
TABLOLAR DİZİNİ vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Üriner Sistemin Gelişimi 3
2.1.1. Pronefrozlar 3
2.1.2. Mezonefrozlar 4
2.1.3. Metanefroz 4
2.1.4. Ürogenital Sinüsün Oluşumu 8
2.1.5. Mesanenin Oluşumu 9
2.1.5.1. Trigonun Oluşumu 10
2.1.6. Üreterin Gelişimi 10
2.2. Megaüreter 11
2.2.1. Primer Obstrüktif Megaüreter 12
2.2.2. Sekonder Obstrüktif Megaüreter 13
2.2.3. Primer Non-obstrüktif Non-reflüksif Megaüreter 14
2.2.4. Sekonder Non-obstrüktif Non-reflüksif Megaüreter 14
2.2.5. Primer Reflüksif Megaüreter 15
2.2.6. Klinik 15
2.2.7. Tanı 16
2.2.8. Tedavi 18
2.3. Transforming Büyüme Factor-Beta (TGF-β) 20
2.3.1. TGF β Reseptör Yapısı ve Sinyal Reseptörleri 21
2.3.2. TGF β Reseptör Sinyali 22
3. GEREÇ ve YÖNTEM 25

3.1. Deney Hayvanları 25
3.2. İmmünohistokimyasal Tanımlama 25
3.3. Fonksiyonel Çalışma 26
3.4. İmmunohistokimyasal İnceleme.....26
3.5. Flowsitometri 27
3.6. İstatiksel Analiz.....28
4. BULGULAR.....29
5. TARTIŞMA.....36
6. SONUÇ.....41
ÖZET 42
SUMMARY.....44
KAYNAKLAR 46

KISALTMALAR

TGF-β	: Transforming büyüme faktör beta
TGFR	: Transforming büyüme faktör reseptörü
ÜVB	: Üreterovezikal bileşke
MGÜ	: Megaüreter
ÜSE	: Üriner sistem enfeksiyonu
RI	: Rezistif indeks
İSUG	: İşeme sistoüretrografi
Tc99-DTPA	: Teknesyum 99- Dietilen Triami Penta- Asetik asit
Tc99- MAG3	: Teknesyum99- MerkaptoAsetilTriGlisin
US	: Ultrasonografi
E	: Embriyonik gün

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa no:

Şekil 1: Beşinci haftada üç boşaltım sisteminin şematik görünümü: Pronefroz, Mezonefroz, Metanefroz 3

Şekil 2: Kalıcı böbrek gelişimi 5

Şekil 3: Nefronların gelişimi 6

Şekil 4: A'dan D'ye kadar embriyo ve fetusların ventral abdominopelvik şematik görünümlerinde (6-9 haftalar arası), böbreklerin pelvisten abdomene yükselişleri ve medial rotasyonları 8

Şekil 5: Ürogenital sinüsün farklılaşması 9

Şekil 6: Haftalara göre üriner sistemin gelişimi 11

Şekil 7: TGF-β1 (A) Rekombinant insan TGF-β1' in Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) yöntemi ile çıkarılan üç boyutlu şeması (B) TGF-β1' in heteronükleer NMR yöntemi ile homodimer ayna görüntüsünün şematize edilmesi 20

Şekil 8: TGF β sinyalizasyon yolu 23

Şekil 9: Ebryonik 18. günde ve postnatal 1. günde alınan distal üreterlerdeki TGF- β ve TGF- β reseptör ekspresyonu 29

Şekil 10: Organ kültürüne ekilmiş üreterlerde SMA ve Ki67 ekspresyonu 32

Şekil 11: Gruplara göre CD31, Ki 67 üretelyal/musküler ve flowsitometrik SMA değerleri 32

Şekil 12: Gruplara göre CD31 değerleri 33

Şekil 13: Gruplara göre üretelyal Ki67 değerleri 34

Şekil 14: Gruplara göre musküler Ki67 değerleri 34

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa no:

Tablo 1: Gruplara göre CD31, Ki67 (üretelyal/musküler) ve anti-SMA flowsitometri pozitif hücre yüzdeleri 30

Tablo 2: CD31, Ki67 (üretelyal/musküler) ve anti-SMA flowsitometri sonuçlarının gruplara arası karşılaştırılması 31

Tablo 3: Gruplara göre total protein ve DNA içeriği 35

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Megaüreter terimi ilk kez Caulk tarafından kullanılmış olup dilate üreteri tanımlamaktadır. Megaüreter iki büyük patolojik tipe ayrılır: 1- masif reflüye bağlı megaüreter 2-terminal üreterin segmental daralmasına veya apistaltik segmente bağlı obstrüktif megaüreter. Her iki tipte de üretre ileri derecede dilate ve tortiöze olabilir. bir grup hastada ise her iki durum birlikte görülebilir ki bu tip megaüreterler obstrüktif ve reflüksif megaüreter olarak adlandırılır.

Çocuklarda normal üreter çapı nadiren 5 mm'den büyük olup; çapı 7 mm'yi aşan üreterlere megaüreter denilmektedir. Kendi içinde 4 alt tipe ayrılır: obstrüktif, reflüksif, non-obstrüktif non-reflüksif, obstrüktif reflüksif. Günümüzde yaygınlaşan görüntüleme yöntemleri ile hastaların çoğu prenatal dönemde tanı almaktadır. Prenatal dönemde tanı almayan çocuklar ise ateşli idrar yolu enfeksiyonu, abdominal ağrı ve nadiren böbrek yetmezliği ile presente olabilirler.

Megaüreter tedavisi zor olmamakla birlikte önemli olan tedavi edilmesi gereken hastaların takip edilmesi gerekenlerden ayırt edilmesidir. Tanıya ve hastanın kliniğine bağlı olarak tedavi izlemden cerrahi operasyon seçeneklerine kadar değişebilmektedir. 2 yaşına kadar takip edilen hastaların %70'inde megaüreter kendiliğinden çözülmektedir.

Sık görülen bir hastalık olmasına karşın günümüzde etyopatogenezi hala net olarak anlaşılamamıştır. Bu konuda bazı hipotezler sunulmuştur. İzleme alınan hastalardaki yüksek rezolüsyon oranları olası bir gelişme geriliğine işaret etmektedir.

Transforming büyüme faktör-β'nın megaüreter patogenezindeki rolü daha önce gösterilmiştir. TGF-β patolojik olarak yüksek ekspresyonu alt

üreterin gelişiminde gecikmeye neden olmaktadır. TGF-β değerlerinin zaman içinde azalması ile megaüreter spontan olarak düzelmektedir.

Biz bu çalışmada farelerde TGF-β ve TGF-β reseptörünün (TGFR) üreterovezikal bileşke (UVB) ve üreterdeki ekspresyon paternini belirlemeyi ve embriyonik organ kültürü modelinde ekzojen TGF-β'nın düz kas gelişimi üzerindeki etkilerinin neler olduğunu saptamayı amaçladık.

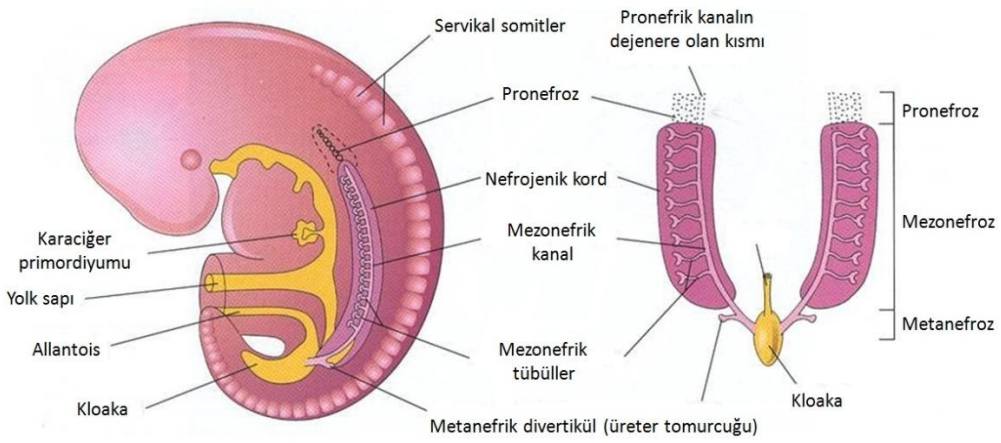
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Üriner Sistemin Gelişimi

Üriner sistem, insan embriyolarında, genital sistemden daha önce gelişmeye başlar. İnsan embriyolarında, kraniyokaudal yönde birbirini izleyen üç boşaltım sistemi gelişir. İlk olarak oluşan böbrek sistemi olan pronefrozlar rudimenterlerdir ve fonksiyonel bir özelliğe sahip değillerdir. İkinci oluşan böbrek sistemi mezonefrozlar daha iyi gelişmişlerdir ve kısa bir süre fonksiyon görürler. Üçüncü olarak oluşan böbrek sistemi metanefrozlar, kalıcı olan esas böbrekleri oluşturan sistemdir (1,2).

2.1.1. Pronefrozlar

Bu bilateral geçici, fonksiyonel olmayan yapılar, insan embriyosunda ilk olarak dördüncü haftanın başlangıcında ortaya çıkarlar. Bu yapılar, embriyonun boyun bölgesinde az sayıda hücre kümesi ve kıvrılmış tübüler yapılar ile temsil edilirler (Şekil 1). Pronefrik duktus kaudal olarak uzanır ve kloaka'ya açılır (Şekil1). Pronefrozlar kısa bir süre içinde dejenerasyona uğrarlar ancak pronefrik kanalların çoğunluğu kalır ve bir sonraki böbrek sisteminde bunlardan yararlanılır.



Şekil 1: Beşinci haftada üç boşaltım sisteminin şematik görünümü: Pronefroz, Mezonefroz, Metanefroz

2.1.2. Mezonefrozlar

Dördüncü haftanın sonuna doğru, rudimenter pronefrozların kaudalinde gelişmeye başlarlar. Orta hattın iki yanında oval ve geniş iki kitle

Oluşturur (Şekil 1). Bu yapılar daha iyi gelişmiştri ve metanefrozlar oluşana kadar geçen yaklaşık 4 haftalık sürede ara böbrekler olarak embriyoda fonksiyon görürler (3). Mezonefrik böbrekler glomerüller ve tübüllerden oluşmuşlardır. Mezonefrik tübüllerin mediyal uçları genişler, daha sonra içeri doğru çöküp mezonefrik bowman kapsülünü oluşturur. Bunun içine dorsal aortadan gelen kapillerler sokulup glomerulusu oluştururlar. Bowman kapsülü ve glomerulusun oluşturduğu yapıya mezonefrik korpuskül denir.

Mezonefrik tübüllerin distal uçları, longitudinal olarak uzanan mezonefrik (wolf kanalı) kanala açılır. Mezonefrik kanal kaudalde kloakaya açılır. Kaudalde yeni tübüller oluşurken, kraniyaldekilerde dejenerasyon başlar. 5. hafta sonlarında, lumbar seviyelerde, 20 çift kadar mezonefrik tübül kalır.

Mezonefrozlar birinci trimesterin sonuna doğru dejenere olurlar. Ancak mezonefrik tübüller, erkeklerde testisin efferent duktulilerine dönüşürler. Mezonefrik kanallardan ise epididim ve vaz deferens oluşur. Kadında ise epiooforon ve paraooforon mezonefrik tübüllerin kalıntısıdır. Mezonefrik kanal kadında ileri gelişme göstermez, körelir.

2.1.3. Metanefroz

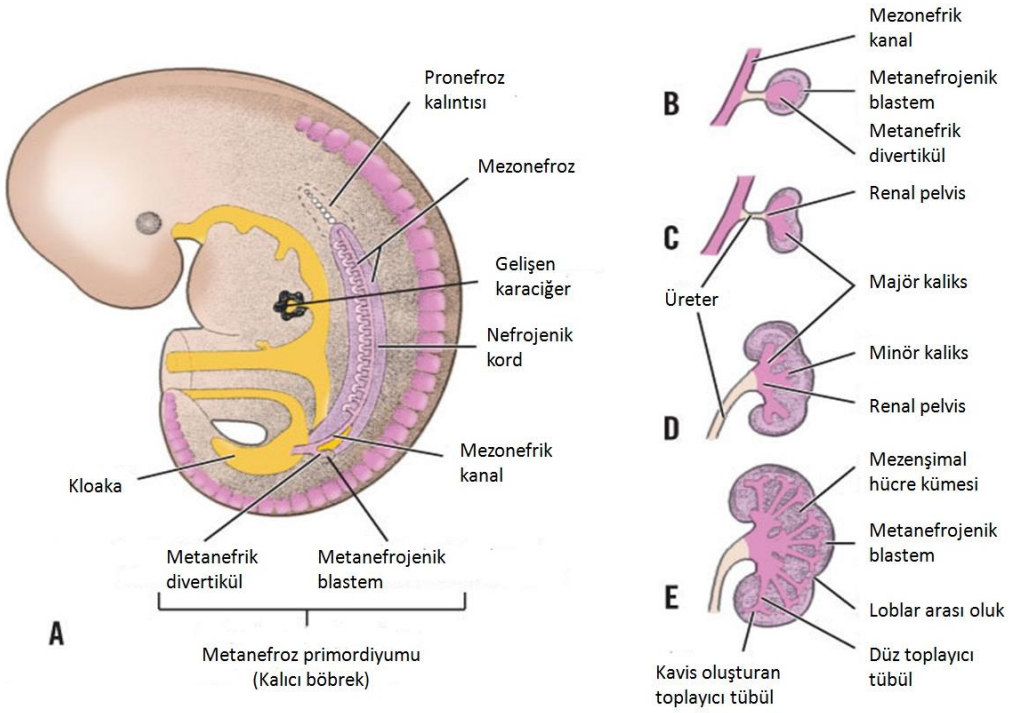
Metanefrozlar (kalıcı böbreklerin primordiyumları) 5.hafta başlarında, sakral bölgedeki intermediyer mezoderm içinde gelişmeye başlarlar, 4 hafta kadar sonra da işlevsel hale gelirler (şekil 2). İdrar oluşumu fetal yaşam boyunca devam eder. Oluşan idrar amniyon boşluğu içine verilir ve burada amniyon sıvısı ile karışır. Olgun bir fetus günde birkaç yüz mililitre amniyon sıvısı yutar ve bu sıvı bağırsaklardan emilir. Yıkım ürünleri, annenin

böbrekleri tarafından atılmak üzere, plasental membran yoluyla anne kanına transfer edilir.

Metanefroz, her ikisi de mezodermal olan iki farklı embriyonik yapıdan gelişir:

1- Metanefrik divertikül (Üreter tomurcuğu)
2- Metanefrik blastem veya mezenşiminmetanefrik kitlesi

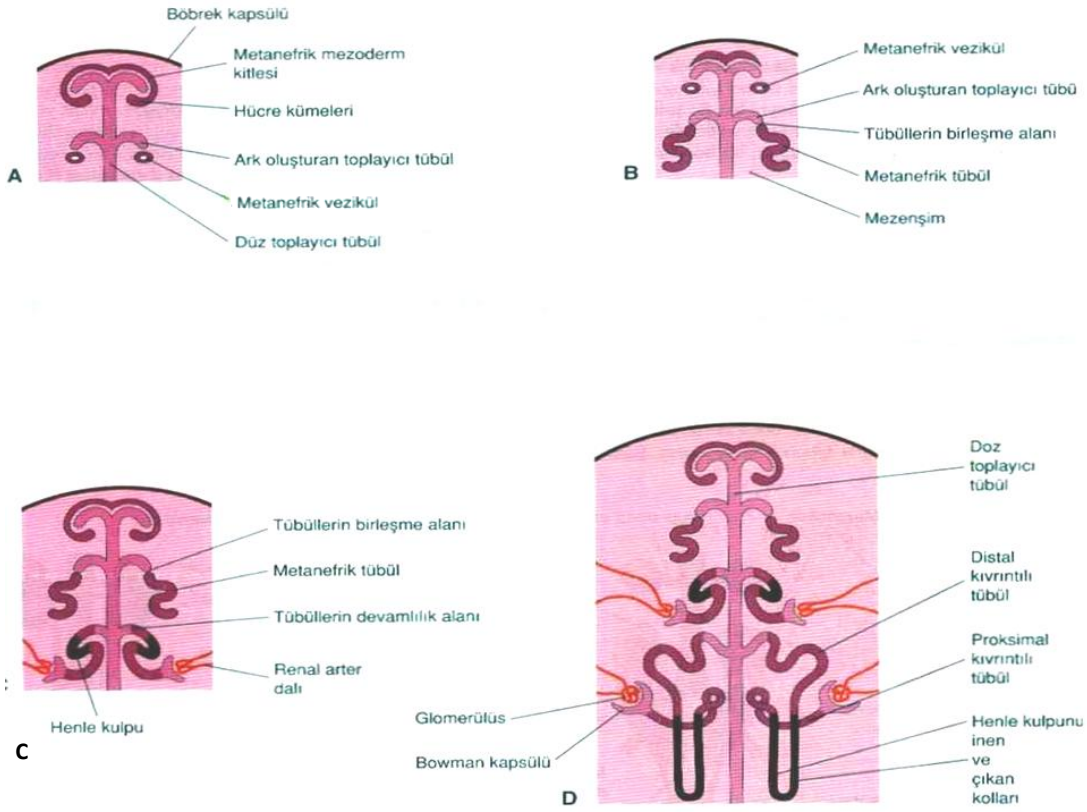
Metanefrik divertikül, mezonefrik kanaldan, kloakaya açılma yerinin hemen üstünde ayrılır. Metanefrik blastema ise, alt lumbar ve sakral bölgelerdeki intermediyer mezoderm içinde gelişir (Şekil 3). Metanefrik divertikül uzayarak, mezenşim kitlesi olan metanefrojenik blastem içerisine penetre olur (Şekil 4B). Metanefrik divertikülün sap kısmı üreter olarak gelişir, divertikülün baş kısmı bölünür ve metanefrozun toplayıcı tübüllerini oluşturur (Şekil 3C-E).



Şekil 2: Kalıcı böbrek gelişimi

A, 5 haftalık embriyonun lateral görünümünde metanefroz primordiyumu izlenmektedir. **B**'den **E**'ye kadar metanefrik divertikülün gelişme safhaları görülmektedir (5-8. haftalar arası).

İlk 4 toplayıcı tübül jenerasyonları genişler ve birleşerek majör kaliksleri; ikinci 4 jenerasyon ise birleşerek minör kaliksleri oluşturur. Her iki toplayıcı tübülün ark oluşturan son kısmı metanefrik mezoderm içerisindeki mezenşimal hücre kümelerini uyararak, küçük metanefrik veziküllerin oluşumuna neden olurlar (Şekil 4A). Bu veziküller uzarlar ve metanefrik tübülleri oluştururlar (Şekil 3B ve C). Böbrek tübüllerinin proksimal uçlarında glomerüller gelişir. Tübüller proksimal ve distal kıvrıntılı tübüllere ve nefron kulpu (Henle kulpu)'na farklılaşırlar; glomerulus ve kapsül ile birlikte nefronu oluştururlar (Şekil 3D). Herbir distal kıvrıntılı tübül, kavis oluşturan bir toplayıcı tübül ile bağlantı kurar ve sonuçta tübüller birleşir.



Şekil 3: Nefronların gelişimi

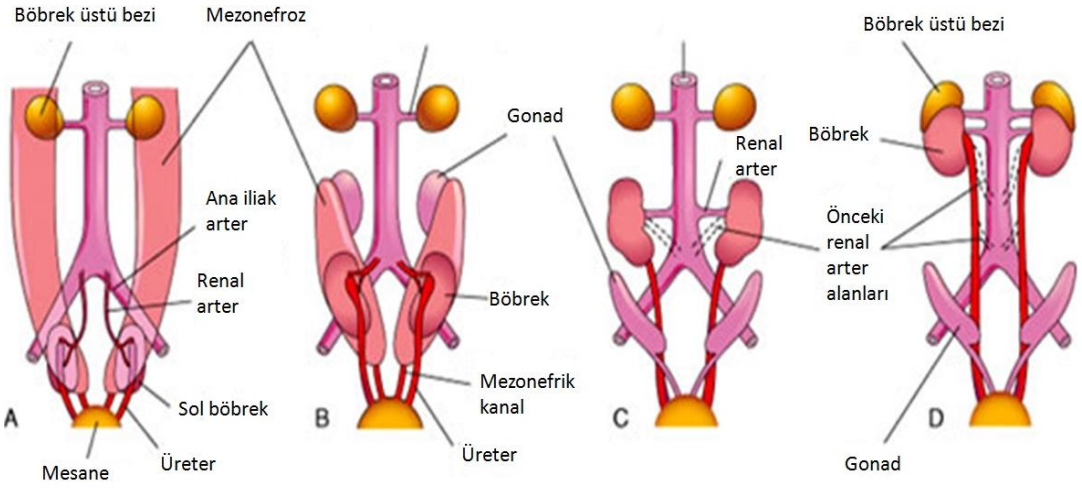
A, nefrogenez yaklaşık olarak 8. haftada başlar. **B** ve **C**, nefronların primordiyumları olan metanefrik tübüllerin, toplayıcı tübüller ile birleşerek uriniferöz tübülleri oluşturmaları görülmektedir. **D,** nefronlar, metanefrojenik blastemden; toplayıcı tübüller metanefrik divertikülden köken almaktadır.

Gebeliğin 10-18. haftaları arasında glomerüllerin sayıları yavaş yavaş artar, daha sonra hızla artarak 32. haftada sayıca en yüksek değere ulaşır. Fetal böbrekler loblara ayrılmışlardır. Lobülasyon, böbreklerde nefronların artması ve büyümeleri sonucunda, genellikle infant dönemde kaybolur.

Böbreklerin işlevsel birimi olan nefronlar, metanefrik blastemadan gelişirler. Gebeliğin sonunda, gelişmiş herbir böbrekte 800.000 ila 1.000.000 arasında nefron bulunur. İdrarın oluştuğu nefronun ve onu dışarı taşıyan yolların normal gelişimi, üreter tomurcuğu ile metanefrik blastema arasındaki indüktif etkileşime bağlıdır. Bu etkileşime resiprokal indüksiyon denir. Üreter tomurcuğu gelişmez ya da metanefrik doku ile temas etmez ise böbrekler gelişmez. Üreter tomurcuğunun normal çatallanarak büyümesi ise metanefrik blastemden gelen indüktif sinyallere bağlıdır. Nefronun gelişmeye başlaması için, her kıvrıntılı toplama borusunun kör ucu, çevresindeki metanefrik blastemin mezodermal dokusunu uyarır. Bu uçların çevresindeki hücreler yoğunlaşarak metanefrik vezikülleri oluştururlar. Bu veziküller uzar ve metanefrik tübüller meydana gelir. Tübüller uzamaya devam ederken, proksimal uçları içe doğru invajine olarak bowman kapsülüne dönüşür. Bu girintiye sokulan kapillerler yumaklar oluşturup, glomerulusu yaparlar. Glomerulus ve bowman kapsülünden oluşan yapı böbrek cisimciğidir. Metanefrik tübül uzayıp kıvrılarak, nefronun parçaları olan proksimal kıvrıntılı tüp, henle kulpu ve distal kıvrıntılı tübü yapar (Şekil 3).

Başlangıçta metanefrik böbrekler sakrumun ventralinde, birbirlerine yakın halde, pelvis içerisinde yerleşmişlerdir (Şekil 5A). Karnın ve pelvisin büyümesi ile birlikte, böbrekler yavaş yavaş karın içerisine yerleşirler ve dah ayukarı doğru hareket ederler (Şekil 4B ve C). Dokuzuncu haftada yetişkindeki pozisyonlarına ulaşırlar (Şekil 5D). Böbreklerin bu göçü embriyonun kaudal vücut kısmının, böbreklere doğru büyümesinden kaynaklanmaktadır. Kaudal vücut kısmının bu seviyelerde büyümesi sonucu, böbrekler aşamalı olarak daha yukarı (kranial) bölgelere yerleşirler. Başlangıçta böbreklere damarların ve sinirlerin girip çıktığı yer olan böbrek hilumu (hilus) ventrale bakmaktadır ancak; böbreklerin yükselmesiyle birlikte

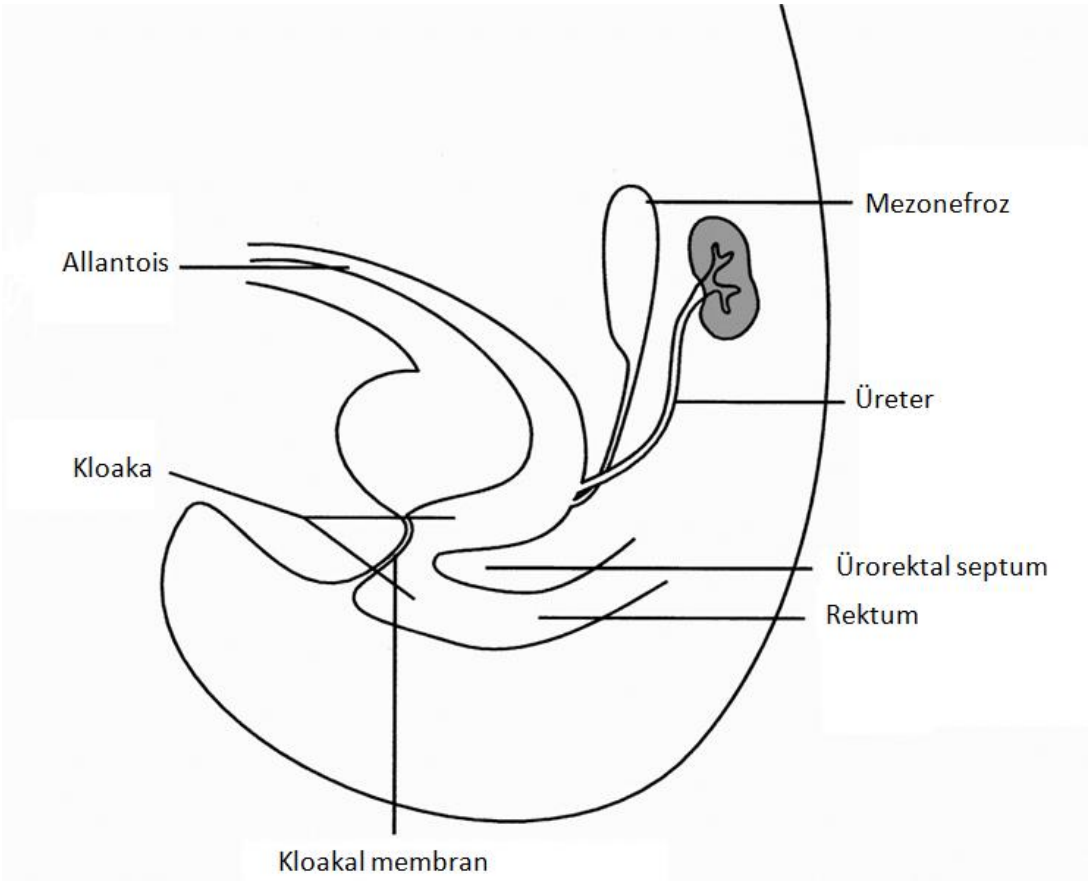
hilus medial hatta doğru 90°'lik bir dönüş yapar. 9. hafta ile birlikte, hilus anteromedial hatta yönelmiştir (Şekil 5C ve D). Böbrekler sonunda karın arka duvarında retroperitoneal hale geçerler.



Şekil 4: A'dan D'ye kadar embriyo ve fetusların ventral abdominopelvik şematik görünümlerinde (6-9 haftalar arası), böbreklerin pelvisten abdomene yükselişleri ve medial rotasyonları

2.1.4. Ürogenital Sinüsün Oluşumu

Ürogenital sinüsün en büyük parçası, sinüsün üst kesiminde yer alan mesanedir. Kloakal membran, gestasyonun 3. haftasında endoderm ve ektodermden oluşan bilamine bir yapı şeklindedir. 4. haftada nöral tüp ve kuyruk, dorsal ve kaudal yönde büyüyerek kloakal membrana doğru projekte olur ve bu büyüme embriyoda katlanmaya neden olur. Kloakal membran bu durumda embriyonun ventral kısmına döner ve endoderm ile sarılı yolk sakın terminal kısmı dilate olur ve kloaka haline gelir (Şekil 5). 5. ve 6. haftada kloakal duvarın iki lateral yükseltisinin birleşmesi ve ürorektal septumun inişi ile kloaka, anterior ürogenital sinüs ve posterior aortik kanala bölünür.



Şekil 5: Ürogenital sinüsün farklılaşması

Nefrik (Wolfian) kanal 24. haftada kloaka ile birleşir ve kloakal ayrışma süresince ürogenital sinüs ile birlikte kalır. Nefrik kanalın primitif ürogenital sinüse girişi, sefalad vezikoüretral kanalın kaudal ürogenital sinüsten ayrımında bir belirteç alarak kullanılır. Vezikoüretral kanal mesane ve pelvik üretrayı oluştururken, kaudal ürogenital sinüs erkeklerde fallik üretra ve kadında distal vajinal vestibülü oluşturur (4).

2.1.5. Mesanenin Oluşumu

10. haftaya kadar mesane gevşek bağ dokusu ile sarılmış tek tabakalı küboid hücrelerle döşeli silindir şeklinde bir tüptür. Apeks allantois ile devamlı olan urakus şeklinde incelir. 12. haftaya kadar urakus fibröz bir bant olacak şekilde incelir ve medial umblikal ligament adını alır. Mesane epiteli 7 ve 12. haftalar arasında çift tabakalı küboidal hücrelerden oluşur ve 13 ile 17. haftalar arasında ürotelyal karakter kazanmaya başlar. 21. haftaya kadar 4-5

hücre tabakası haline gelir. 7-12 haftalar arasında çevre bağ doku yoğunlaşır ve düz kas lifleri görülmeye başlar. Düz kaslar öncelikle mesane tavanında görülürler ve mesane boynuna doğru uzanırlar. Kollajen lifler ilk olarak lamina propriada görülür ve sonrasında kas lifleri arasında daha derine uzanırlar.

Embryolojik olarak bakıldığında, mesane iki bölgeden oluşur: trigon ve mesane kitlesi. Mesane kitlesi endoderm ile kaplanmış vezikoüretral kanal ve onu saran mezenkimden oluşur. Trigon ise genel toplayıcı kanalların gelişen mesane tabanıyla birleşmesinden oluşur (5).

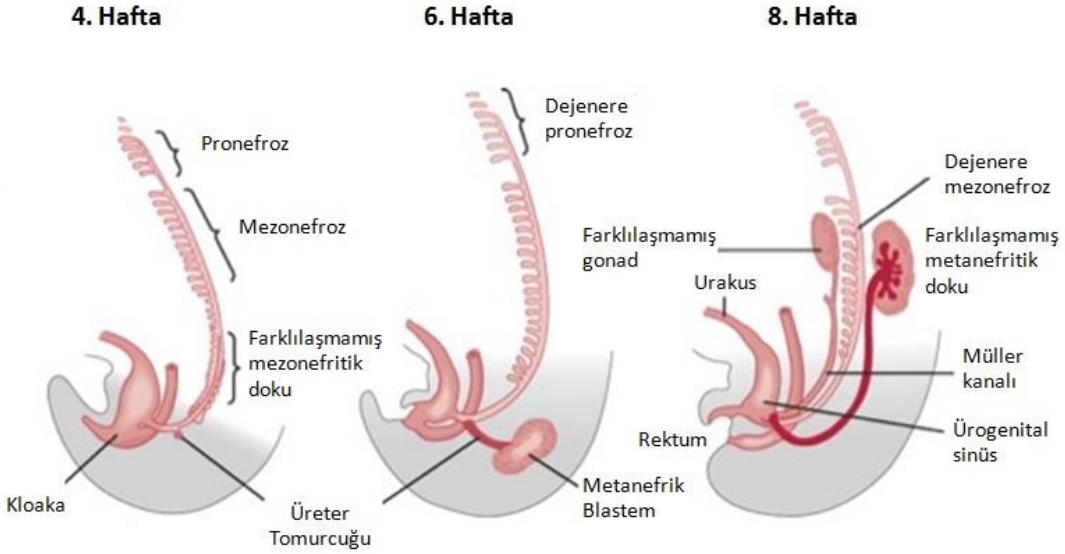
2.1.5.1. Trigonun Oluşumu

Gestasyonun 33. gününe kadar genel boşaltıcı kanallar (üreter tomurcuğunun orijininin distalinde bulunan mezonefrik kanalların parçaları) genişler ve ürogenital sinüs içine emilirler. Sağ ve sol genel boşaltıcı kanallar orta hatta üçgensel bir bölge olarak birleşerek primitif trigonu oluştururlar. Üreter orifisi ekstrofiye uğrar ve mesaneye doğru 37. günde uzayarak mesane tavanında kranial ve kaudal yönde göç eder. Bu süreç sırasında nefrik kanal üreter orifisinden uzaklaşır ve kaudal olarak ürogenital sinüs düzeyinde paramezonefrik kanalın (müllerian) yanından geçerek ilerler. Burası ileri dönemde erkekte verumontanuma, kadında ise vajinal kanala dönüşecektir.

2.1.6. Üreterin Gelişimi

Üreter tomurcuğu mezonefrik kanaldan köken alır (şekil 6). Üreter, insanda gevşek mezenkimal hücrelerle sarılmış basit bir küboidal epitel tübülü olarak başlar ve gestasyonun 28. gününde tamamlanmış bir lümen halini alır. Gelişen üreterlerde 37-40. günler arasında geçici bir kanal tıkanıklığı olur ve sonrasında rekanalizasyon orta üreterden başlayarak iki uca doğru ilerler. Üreter kas yapısının oluşumu ve elastik membranın gelişimi ilk olarak 12. haftada başlar. Sıçanlarda ve insanlarda, üreter düz kas fenotipi mesanedeki oluşumdan sonra ortaya çıkar. İlk düz kas farklılaşması mesanenin tavanında subserozal olarak başlar ve mesane boynuna doğru

uzanır. Üreterdeki düz kas farklılaşması ise bu dönemden sonra üreterovezikal bileşkede subepitelyal olarak başlar ve proksimale doğru devam eder. 10. haftadan önce, elastik lifler sayıca az olup çok az gelişmiştir ve rasgele sıralanmıştır. 12. hafta sonrasında ise bu lifler üreter boyunca fazlalaşır ve spesifik yerleşimlerde görülürler (5,6) (Şekil 7).



Şekil 6: Haftalara göre üriner sistemin gelişimi

2.2. Megaüreter

Megaüreter (MGÜ) terim olarak geniş veya büyük üreter anlamına gelmektedir. Çocuklarda normal üreter çapı nadiren 5 mm'den büyük olup; çapı 7 mm'yi aşan üreterlere megaüreter denilmektedir (7). Uluslararası sınıflandırma sistemine göre megaüreterler 4 gruba ayrılır (8):

1. Reflüksif
2. Obstrüktif
3. Reklüksif ve obstrüktif
4. Non-obstrüktif, non-reflüksif

Eğer altta yatan ikincil bir sebep yoksa primer megaüreter; enfeksiyon, diabetes insipitus, üretere dıştan bası, nörojenik mesane, posterior üretral valv gibi altta yatan nedenler varsa sekonder megaüreter olarak adlandırılır.

Primer megaüreter erkeklerde kızlara göre 4 kat daha sık görülür. Sol tarafta yaklaşık 3 kat daha fazladır ve vakaların %25'inde iki taraflıdır. Tek taraflı olgularda ise diğer böbrekte displazi veya agenezi görülme olasılığı %10-15'tir (9). Prenatal hidronefroz olgularının yaklaşık %25'inin nedeni megaüreterdir. Obstrüktif üropatiler içinde en sık görülen ikinci neden pyeloplastiden sonra megaüreterdir (10). Bu bilgilerden de anlaşıldığı gibi megaüreter sık görülen bir patoloji olup pediatrik ürologların günlük pratiklerinde sıklıkla karşılaştıkları bir durumdur.

2.2.1. Primer Obstrüktif Megaüreter

Primer obstrüktif megaüreter tanımı fonksiyonel bir darlığı işarete etmektedir. İdrar akışını kısmen engelleyen aperistaltik bir üreterovezikal segmente bağlı olduğu düşünülmektedir. Nadiren gerçek bir stenoz mevcuttur; ancak fonksiyon değişikliğine yol açabilen histolojik anomalilerin birçok farklı varyasyonu tanımlanmıştır. Bu anomaliler arasında kas dezoryantasyonu (11,12), kas hipoplazisi, kas hipertrofisi ve mural fibrozis (13) bulunmaktadır. Işık ve elektron mikroskobilerinde üreterovezikal bileşke düzeyinde aşırı kollajen tip 1 ve 3 (tip 1 ağırlıklı) depolanması görülmüştür (14,15). Teorik olarak artmış matriks depolanması hücre birleşim noktalarında değişikliğe yol açar ve myoelektrik dağılımı ile peristaltizmi bozar. Bu segmente düzensiz dalga paternleri görülür.

Obstrüktif megaüreter etyolojisi üzerine birçok farklı teori bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda üreteral segmentte içte bulunan longitudinal kas tabasında atrofi ve dışta bulunan sirküler kas tabakasında hipertofi saptanmıştır. Longitudinal kas tabasının peristaltizmden sorumlu olduğu düşünülerek, bu durumun obstrüksiyona neden olabileceği bildirilmiştir (12). Neden distal üreterin olaya her zaman katıldığı açık değildir,

ancak bu durum üreterin en son gelişen kısmı olan bu segmentin, kas yapısının gelişimindeki duraklama ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (16).

Orijini ne olursa olsun, bozulmuş peristaltizm serbest idrar akışını engeller ve fonksiyonel bir obstrüksiyon meydana getirir. Retrograd akım ile de, birikmiş idrar bolusunun anormal distal segmenti geçmesi daha da güçleşir. Adinamik segmentin proksimalindeki üreter segmentinde de aritmik dalgalanmalar görülür. Üreteral dilatasyonun derecesi inkomplet pasaj nedeniyle proksimalde biriken idrar miktarına bağlıdır. Eğer toplayıcı sistem, proksimaldeki basıncı azaltamayacak durumdaysa üreteral dinamiklerdeki harabiyet, renal parankime yönelen bir tehlike oluşturur.

Primer obstrüktif MGÜ'in nadir sebepleri arasında konjenital üreteral striktürler ve üreter valvler yer alır.

2.2.2. Sekonder Obstrüktif Megaüreter

MGÜ'in bu formu nörojenik ya da non-nörojenik işeme disfonksiyonu ya da posterior üretral valv gibi infravezikal obstrüksiyon nedenleri ile birlikte görülür. Üreterovezikal bileşke (ÜVB) üzerinde oluşan basınç, 40 cmH2O ya da üzerinde olduğunda, üreterin idrar bolusunda artan bir zorluk oluşur. Bu basınçlar kontrol edilmediği takdirde progresif üreteral dilatasyon, ÜVB dekompansasyonu, reflü ve renal harabiyet beklenebilir. Bu nedenden dolayı oluşan dilatasyon, infravezikal basınç artışının sebeplerine yönelik tedaviler uygulandığında gerileme gösterir. Aksi takdirde, üreterin değişmiş kompliansından ya da peristaltizmin bozulmasından, ya da her ikisinden dolayı üreter sürekli dilate kalır. Bazı olgularda kronik enfeksiyon nedeniyle transmural skar oluşumu bildirilmiştir. Bir kısım üreterlerde obstrüksiyon tam olarak bulunmamasına rağmen; kompliansını kaybetmiş, artmış intravezikal basıncı proksimale yansıtan üreterlerin böbreği tamponlama yeteneği azalır (17). Diğer obstrüktif megaüreter nedenleri arasında üreteroseller, üreteral ektopi, mesane divertikülü, periüretral post reimplantasyon fibrozisi, nörojenik mesane ve retroperitoneal tümörlerin dıştan basısı, kitleler ya da aberan damarlar sayılabilir.

2.2.3. Primer Non-obstrüktif Non-reflüksif Megaüreter

Yenidoğanda en sık rastlanılan primer megaüreter nedenidir ve etyolojisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır (18,19). Primer non-obstrüktif non-reflüksif megaüreter tanımı, reflü, obstrüksiyon ve sekonder dilatasyon nedenleri ekarte edildiğinde kullanılmalıdır.

Fetal böbrek, glomerüler filtrasyondaki, renal vasküler rezistanstaki ve konsantrasyon yeteneğindeki farklılıklardan dolayı, doğumdan önce doğumdan sonrakine oranla 4-6 kat daha fazla idrar üretir. Bu nedenle diabetes insipitusa benzer bir tablo oluşmakta, daha komplian fetal üreter genişlemektedir. Bu dilatasyona bağlı olarak da üreterovezikal bileşkenin ve üreteral peristaltizmin gelişimi gecikmektedir. Gelişimin farklı basamaklarında oluşan elastin, kollajen ve diğer matriks materyallerinin birikim ve oryantasyonundaki değişikliklerin sonucunda da üreteral kompliansın gelişiminde farklılaşma ve konfigürasyon değişimleri görülür (20). Fetal 11-21. haftalarda gözlenen ve kas hücrelerinde diferansiasyonu geciktiren transforming büyüme faktör betanın (TGF-β) üreterdeki aktivitesinin, 2 yaş altında obstrüksiyon dışı nedenle opere edilen çocuklarda devam ettiği gösterilmiştir. TGF-β'nın ilk 2 yaş içinde progresif azalması primer megaüreter için etken olabileceğini düşündürmektedir.

2.2.4. Sekonder Non-obstrüktif Non-reflüksif Megaüreter

Üreteral anatomiye bağlı olmaksızın gelişen nonobstrüktif nonreflüksif megaüreterler sekonder olarak adlandırılır. Non-obstrüktif non-reflüksif megaüreter sanıldığından daha çok görülür ve sıklıkla tanımlanabilen bir sebebe sahiptirler. Örneğin, peristatizmi inhibe eden bakteriyel endotoksinlerin eşlik ettiği, akut ÜSİ nedeniyle belirgin üreteral dilatasyon meydana gelebilir ve uygun antibiyotik tedavisiyle iyileşme beklenir (21).

Maksimal üreteral peristaltizmi aşan miktarda idrar çıkışına yol açan nefropatiler ya da diğer patolojik durumlar, toplayıcı sistemin artan idrar miktarına yukarıda cevap vermesiyle üreteral dilatasyonda progresyona yol

açarlar. Bu patolojik durumlar arasında lityum intoksisitesi, diabetes mellitus, diabetes insipitus, orak hücre nefropatisi ya da psikojenik polidipsi sayılabilir (22). Non-obstrüktif megaüreterlerin en uç örnekleri Prune-Belly Sendromu içinde yer alır. Bu durumda, ileri derecede tortiöz ve dilate üreterler görülmesine karşın, böbrek sağlıklıdır ve normal fonksiyon gören parankimi vardır (23).

2.2.5. Primer Reflüksif Megaüreter

Reflüksif megaüreterlerde yaklaşım antenatal tarama metodlarının gelişimi ile değişmiştir. Grade 4 ve 5 reflülü yenidoğan ve infantlarda rutin olarak cerrahi önerilmemektedir. Aksine infantlık süresince rezolüsyon trendi varsa medikal tedavi yaklaşımı daha uygundur. Tersi durumlarda ve persistan yüksek dereceli reflüsü bulunan büyük çocuklar ve yetişkinlerde hala cerrahi önerilir. Nadiren medikal tedavinin başarısız olduğu ancak rekonstrüktif cerrahi için küçük bulunan çocuklarda tek taraflı reflü için distal üreterostomi ya da bilateral reflü için vezikostomi ideal bir geçici çözüm yoludur.

Reflüksif megaüreterin %2'inde değişen derecelerde obstrüksiyon saptanmaktadır (24).

2.2.6. Klinik

Megaüreter olgularının yarısından fazlasına fetal ultrasonografide (US) tanı konulmakta ve asemptomatik seyretmektedir. Bazı hastalar ise abdominal cerrahi sırasında raslantısal olarak tanı almaktadır. Eğer tanı prenatal konulmadı ise; ateşli üriner enfeksiyon, abdominal kolik ağrı veya rahatsızlık semptomları verebilir. Mikroskobik hematüri sıklıkla görülür. Hematüri sıklıkla genişlemiş üreterdeki mukozal damarlardan kaynaklanmakla beraber olası taş ve enfeksiyon varlığı da göz ardı edilmemelidir. Nadiren böbrek yetmezliği ile de karşımıza çıkabilirler.

2.2.7. Tanı

Günümüzde prenatal bakım ve takip standartları gereği prenatal ultrasonografinin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu nedenle günümüzde megaüreter hastalarının çoğu prenatal dönemde tanı almaktadır. Megaüreter tanısındaki temel sorun tanının koyulması değil megaüreterin obstrüktif olup olmadığının belirlenmesidir.

Tanı alan bir hastada ilk yapılması gereken test üriner ultrasonografidir. Ultrasonografi basit, güvenli ve ağrısız bir çalışma olur; böbrek boyutları, parankim kalınlıkları, parankim ekojenitesi ve üriner sistem yapısı hakkında önemli bilgiler vermektedir. Genişlemiş üreter böbrekten mesaneye girdiği yere kadar takip edilebilir. Mesanenin hemen arkasında üreterin inceldiği gözlenebilir. Megaüreter olgularında sıklıkla renal pelvis ve kalikslerden daha geniş üreter izlenmektedir. Bazı olgularda ise sadece üreterin 1/3 distali geniş olabilmektedir. US takip açısından da önemli bir tetkiktir. Doppler US'de rezistif indeks (RI) ölçümü ve her iki böbrek arasındaki RI farkının değerlendirilmesi (∆RI) önemlidir. RI'in çocuklardaki obstrüksiyon için toplam doğruluk oranı %75 seviyesindedir. RI'in 0,70'den düşük olduğu ve ∆RI'nın 0,06-0,10'dan büyük olması obstrüksiyon lehinedir.

US'de pelvik veya üreteral dilatasyon görülürse reflüyü ekarte etmek için işeme sistoüretrogramı (İSUG) çekilmelidir. Bu sayede mesane ve üretra anatomisi hakkında da bilgi sahibi olunur (21).

Renografi anatomik detay ve fonksiyonlar hakkında bilgi verdiği için obstrüksiyonu değerlendirmede en sık kullanılan tetkiktir. Klirensi sadece glomerüler filtrasyona bağlı olan Teknesyum 99- Dietilen Triami Penta- Asetik asit (Tc99-DTPA) ve renal plazma akımına bağlı olan Teknesyum99-MerkaptoAsetilTriGlisin (Tc99- MAG3) en sık kullanılan farmasötiklerdir. Yenidoğan döneminde düşük glomerüler filtrasyon hızı olması ve yüksek artefakt oranından dolayı Tc99-DTPA'dan ziyade Tc99- MAG3 daha çok tercih edilen ajandır. Separe böbrek fonksiyonları, diüretik ile de yapılabilen yıkanma eğrileri ve yarılanma zamanları (T1/2) renografide en çok dikkat

edilen parametrelerdir. DiMerkaptoSüksinikAsit (DMSA) sintigrafide separe renal fonksiyonun daha iyi saptanabildiği savunulmaktadır. Bunun dışında radyofarmasötik enjeksiyonundan 2-3 dakika sonra böbreğin radyoizotopu uptake oranından elde edilen ve glomerüler filtrasyon hızı ile korelasyon katsayısı 0,92 olan ekstraksiyon faktörü ise diğer önemli parametrelerdir (21).

Her ne kadar renografik incelemelerden objektif veriler elde edilse de; sonuçlar, ilaç dozu, diüretiğin uygulanma zamanlaması, hasta hidrasyonu gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bu nedenle renografi yapılırken uyulması gereken protokoller vardır. Hasta çok iyi hidrate edilmeli ve işlem boyunca sonda ile mesane boş tutulmalıdır. Obstrüksiyonun değerlendirilmesi için böbrek ve üreter alt ucu olmak üzere 2 farklı alandan ölçüm yapılmalıdır. Diüretik uygulama zamanlaması için radyofarmasötik enjeksiyonundan 20 dakika sonra uygulama yerine, 15 dakika önce uygulanması önerilir (F15 protokolü) (21,25). Böylece 15-18 dakikada etki eden furosemidin maksimum etkisi radyofarmasötik enjeksiyonu ile aynı zamanda başlamakta ve yanlış pozitif sonuçlar önlenmektedir. Yenidoğan döneminde glomerüller yeterince gelişmediği için diüretiğe yeterli yanıt verememektedir. Bu nedenle renografinin 3. aydan sonra planlanması önerilir (25).

Renogramdan elde edilen yarılanma zamanı (T1/2) obstrüksiyon hakkında bilgi verir. T1/2 10 dakikanın altında ise obstrüksiyon yoktur, 10-20 dakika arasında süpheli, 20 dakikadan uzun ise obstrüksiyon lehine yorumlanır. Fakat megaüreter varlığında, dilate toplayıcı sistemdeki yüksek kapasite nedeniyle radyoizotop drenajı gerçek bir obstrüksiyon olmamasına rağmen gecikebilir (21).

DTPA'da ölçülen ekstraksiyon faktörü enjeksiyon 2-3 dakika sonraki uptake oranıdır ve böbrek fonksiyonları hakkında bilgi verir. Ekstraksiyon faktörü yenidoğanda %1,5'dan 1 yaşında ise %2,5'dan az olmalıdır. Bu değerin glomerüler filtrasyon hızı ile korelasyonu %92'dir (25).

Tüm bu tanı yöntemlerinin hiçbiri tek başına altın standart olmadığı için testlerin kombine kullanımı ve cerrahın tecrübesi önem kazanmaktadır.

2.2.8. Tedavi

Megaüreter tedavisi zor olmamakla birlikte önemli olan tedavi edilmesi gereken hastaların takip edilmesi gerekenlerden ayırt edilmesidir.

Sekonder megaüreter tedavisi altta yatan nedenin ortadan kaldırılmasına yöneliktir. Reflüksif megaüreter tedavisi ise vezikoüreteral reflü tedavisi ile benzerdir.

Eğer obstrüksiyon ve reflü ekarte edilip non-obstrüktif non-reflüksif megaüreter tanısı konuldu ise bu hastalar genellikle asemptomatik oldukları için ve çoğu ömrü boyunca hiçbir bulgu vermeyeceği için aktif tedavi yaklaşımı yerine beklemek daha uygun olacaktır. Bu hastalarda koruyucu antibiyotik tedavisi ve düzenli aralıklarla takip önerilmektedir. Eğer takiplerde böbreklerde hasarı ve sık tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları görülürse cerrahi tedavi düşünülebilir. 2 yaşına kadar takip edilen hastaların %70'inde megaüreter kendiliğinden çözülmektedir.

Tedavi yaklaşımını belirlerken esas sorun teşkil eden grup primer obstrüktif megaüreter hastalarıdır. Eğer kolik ağrı, hematüri, taş, ateşli idrar yolu enfeksiyonu ile seyreden veya komplike megaüreter varsa bu olgularda cerrahi düşünülebilir. Fakat prenatal US'nin yaygın kullanımı ile yenidoğan döneminde artan oranda megaüreter saptanmakta ve bu olguların çoğu da normal böbrek ve vücut gelişimi ile birlikte asemptomatik olduğundan cerrah için karar vermek zorlaşmaktadır.

Hastaların büyük çoğunluğunun asemptomatik olması ve takip süresince megaüreterin kendiliğinden çözülmesi nedeniyle konservatif tedaviler daha sık tercih edilmektedir. Konservatif tedavide 3 temel değişken takip edilmektedir. Bunlar semptomlar, görüntüleme ve antibiyotik profilaksisidir. Görüntüleme yenidoğan döneminde daha sık aralıklarla

yapılırken, dilatasyon stabilize olduktan sonra takip aralıkları açılabilir. Profilaktik antibiyotiğe doğumdan hemen sonra başlanmalıdır. Amoksisilin 15 mg/kg veya 2 aydan sonra trimetoprim 2 mg/kg dozunda önerilebilir.

Cerrahide amaç, üreteri yeni submukozal tünel ile, uzunluk/çap oranı 4-5/1 olacak şekilde reimplante etmektir. Üreteri daraltırken vasküler yapıyı korumak, iskemik striktüre ikincil obstrüksiyon gelişmesini engellemek ve peristaltik hareketi koruyabilmek için önem taşımaktadır. Cerrahi planlanan hastalarda üretrik reimplantasyon hem reflüksif hem de obstrüktif megaüreter cerrahisi için esastır. Obstrüktif megaüreter varlığında distal adinamik segment eksize tamamen eksize edilmelidir ve bu aşamadan dilate üreter reimplantasyona uygun boyuta getirilmelidir. Tüm megaüreter vakalarında mesaneye uygun submukozal tünel yapılabilmesi için üretere tapering uygulanmalıdır. 3 farklı cerrahi tekniği mevcuttur:

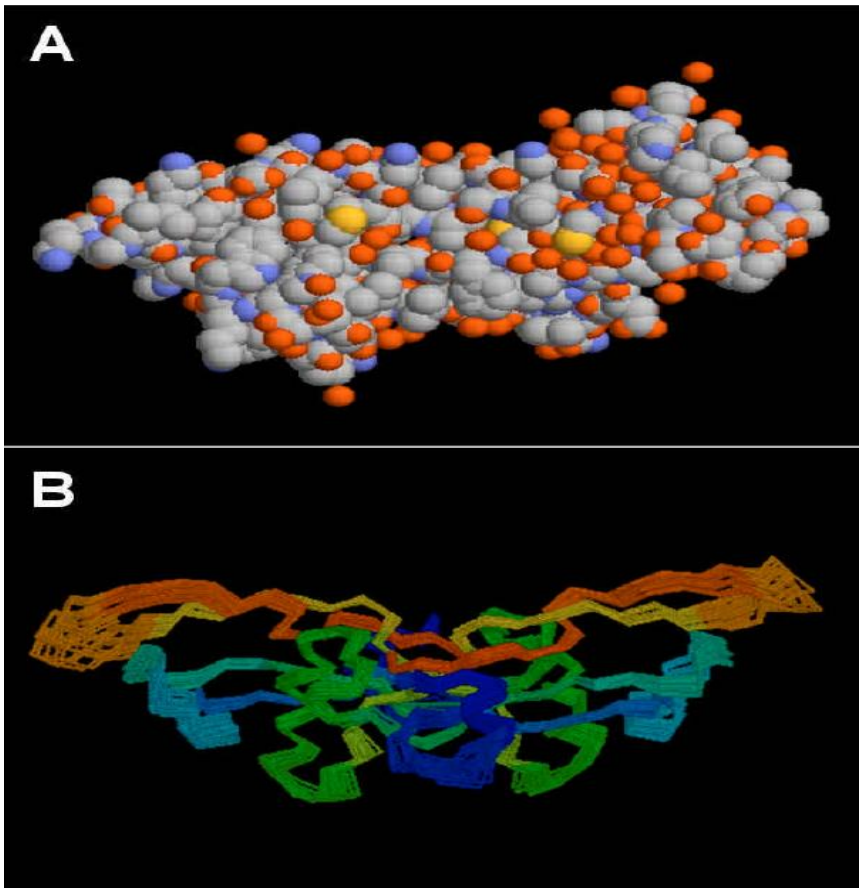
1. Eksizyonel daraltma (talering tapering)
2. Katlanarak daraltma
3. Plikasyon

Hendren 1969 yılında, eksizyonel daraltma yöntemini tarif etmiş ve uzun dönemde başarılı sonuçlar rapor etmiştir (26). Kalicinski ve arkadaşları, 1977 yılında, üreterin vaskülarizasyonunu daha iyi korunduğunu öne sürerek, üreterin katlanarak daraltılması tekniğini tanımlamışlardır (27). Starr 1979 yılında bu teknikte değişiklik yaparak üreterin plikasyonu yöntemini tanımlamıştır (28). Eksizyonel daraltma ve Starr plikasyon cerrahi tedavi yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada iki tekniğin birbirine karşı, belirgin üstünlüklerinin olmadığı ancak plikasyon tekniğinde vasküler yapının daha iyi korunduğu gösterilmiştir (29). Megaüreter olgularında üreter rekonstrüksiyonunda cerrahi başarı, uygun reimplantasyon prensiplere göre yapılan olgularda kullanılan cerrahi teknikten çok mesanedeki patolojilerle ile ilgili olduğu gözükmektedir. Mesanenin yapısı antireflüksif girişimlerin başarısını etkileyebilmektedir (29). Günümüzde en popüler prosedürler, Lich-

Gregoir, Politano-Leadbetter, Cohen ve Psoas-Hitch üreteroneosistostomileridir (8).

2.3. Transforming Büyüme Factor-Beta (TGF-β)

TGF-β ailesi diğer büyüme faktorlerine nazaran daha yakın zamanda tanımlanmıstır. TGF β "nodal", "aktivin", BMP (kemik morfogenik protein) ve AMH (antimullerian hormon)'yi de kapsayan, doku homeostazının sürdürülmesi ve embriyonik gelişimin kontrolünde önemli rolleri olan geniş bir sitokin ailesinin başlıca üyesidir (şekil 7).



Şekil 7: TGF-β1 (A) Rekombinant insan TGF-β1' in Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) yöntemi ile çıkarılan üç boyutlu şeması (B) TGF-β1' in heteronükleer NMR yöntemi ile homodimer ayna görüntüsünün şematize edilmesi

Birçok hücre tarafından sentezlenen TGF β hücre bölünmesi (proliferasyon), farklılaşması, adhezyon, morfogenez, ekstraselüler matriks oluşumu ve programlı hücre ölümü gibi çeşitli hücresel süreçlerin kontrolünü sağlamaktadır. Bu büyüme faktörünün sinyalizasyon yolu birçok farklı yollar ile etkileşerek hücrenin homeostazını sağlamaktadır (30,31). TGF β üretimi genetik kontrol altındadır (32). TGF-β' nın farklı izoformları farklı genlerle kodlanır. Butun genler 100 kb' tan fazla uzunluğa sahiptir ve 7 ekson icerir. Genler değisik kromozomların haritasını olusturur. TGF-β1 geni 19q13 insan kromozomunu, TGF-β2, 1q41, TGF-β3 de 14q24 nolu insan kromozomlarını haritalandırır. TGF-β3 geni embriyonik kalp ve akciğer dokusunda cok fazla fakat karaciğer, dalak, bobrek dokularında sınırlı olarak gorulur. TGF-β1 dalak dokusunda cok fazla gosterilmistir [33].

TGF β hücre farklılaşmasında, embriyogenezis, damarlanma, göç ve hücre döngüsü düzenlemesinde rol alır. TGF β1, yapısal olarak düzenleyici proteinler ile ilişkili olan bir ailenin üyesidir ve TGF β'nın 5 izoformu vardır (TGF-β1, 2, 3, aktivin/inhibin ve BMP). Ayrıca TGF β1 tümör oluşumunda, progresyon, infiltrasyon ve metastaz oluşumunda görevli sinyal yollarında rol oynar ve hücre siklusunda G1'den S fazına geçişte blok olabilen en önemli büyüme faktörlerinden biridir (34). Hücre döngüsünün kontrolünde ve karsinojenik süreçte anahtar rol oynar (35). TGF β sinyalizasyon yolunun bozulması kanserde büyük önem taşır. TGF β, proapoptotik etkisiyle epitelyal hücre proliferasyonu ve inflamatuar cevabını baskılayarak tümör supresör gen gibi davranır. Ayrıca tümöral dokularda onkogenik özellikler sergileyerek, kontrolsüz proliferasyon, metaplazi, displazi, aplazi, metastaz gibi olayların gerçekleşmesine de aracılık eder (36).

2.3.1. TGF β Reseptör Yapısı ve Sinyal Reseptörleri

TGF β ailesi üyeleri serin/treonin kinaz aktivitesine sahip reseptörlere bağlanarak hücresel hareketlerini başlatırlar. Serin/treonin kinazlar tip 1 ve tip 2 reseptör olarak iki alt familyaya ayrılırlar. Reseptör bağlama yöntemleri üzerine moleküler ağırlıklarına dayanarak ayırt edilirler. Tip 1 reseptör 500

aminoasitten oluşur ve 55 kDa moleküler ağırlığında, Tip 2 reseptör ise 570 aminoasitten oluşur ve 70 kDa moleküler ağırlığındadır. Farklı türlerin oluşturduğu her alt familya farklı ligandlı yapısal ve fonksiyonel benzerliklerine göre gruplandırılan üyeler içerebilirler (37).

TGF β reseptörleri kısa ekstrasellüler bölgeleri olan, bir tek transmembran bölgesi ve kinaz aktiviteli daha uzun sitoplazmik bölgeden oluşan glikopoteinlerdir. Tip 1 ve tip 2 reseptörlerin her ikisi de serin/treonin kinazların canonical sekanslarıyla uyumlu bir kinaz bölgesine sahiptir ve reseptör tipleri yapısal olarak ayırt edilebilir. Örneğin, tip 1 reseptörü daha kısa ekstrasellüler domaine sahiptir ve bir GS domaini kinaz bölgesine doğrudan komşudur. Bu 30 aminoasit bölgesi TTSGSGSG sekansında glisin (G), serin (S), treonin (T) bölgesi içerirler.

TGF β sinyalizasyonunda tip 1 ve tip 2 reseptörler en önemli reseptörler olmasına rağmen, aksesuar reseptör olarak adlandırılır (37).

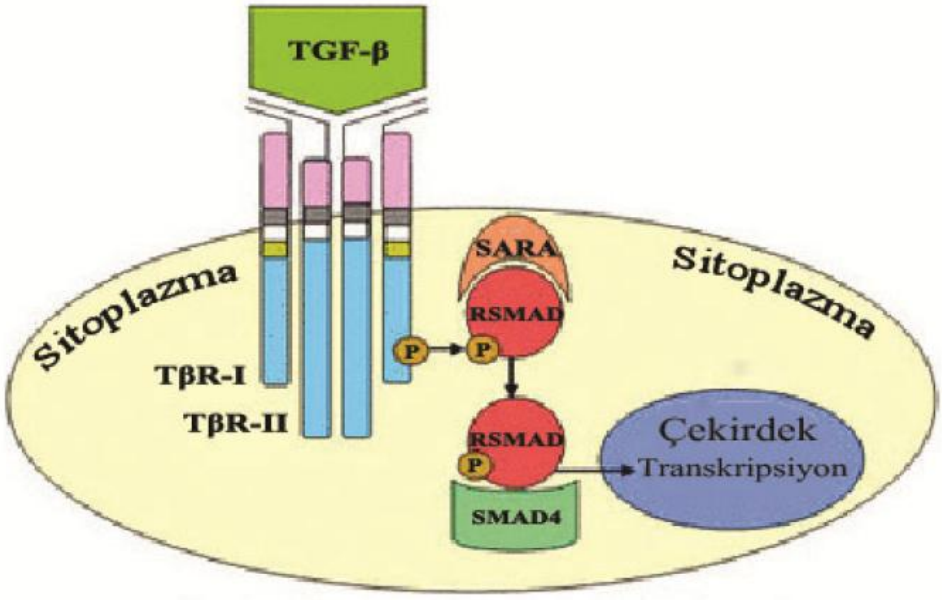
Endoglin ve betaglikan olarak da adlandırılan TGF β tip 3 reseptörleri

(TβRIII) TGF β'nın ilk iki tip reseptörlerine bağlanmasını kolaylaştırır. TGF β, tip 2 reseptörün membran dışı bölgesine, sonra da tip 1 reseptörüne bağlanır (36).

2.3.2. TGF β Reseptör Sinyali

Hücrede inaktif pro-peptid şeklinde sentezlenen TGF β, latent TGF β-bağlayan proteinler (LTB β) ile kompleks oluşturarak latent (inaktif) TGF β formunda salgılanır. Pro-peptidin N-terminalinde "latency associated protein" (LAP) 16 olarak adlandırılan bir dizi bulunur. Latent TGF β'nın yapısından LTBP ve LAP proteinlerinin serin proteazlar aracılığı ile uzaklaştırılması (veya LAP'ın konformasyonel değişimi) sonucu aktif TGF β oluşur. TGF β sinyalizasyon yolunun aktivasyonu, ligandın reseptörlerine bağlanması ile başlatılır (38) (Şekil 8).

Bir kaskad şeklinde ilerleyen TGF β sinyalizasyon yolunun aktivasyonu, ligandın tip 2 reseptöre bağlanması ile başlatılır. TGF β tarafından kompleks oluşması, reseptörlere bağlanmaya ihtiyaç duyar çünkü tip 1 reseptör, tip 2 reseptör yokluğunda liganda bağlanamaz. TGF β, tip 2 reseptörün membran dışı bölgesine, sonra da tip 1 reseptörüne bağlanır. Böylece aktiflenmiş TβRI sitozolde bulunan Smad proteinleri fosforiller. Oluşan ligand/reseptör kompleksi ikişer TβRI ve TβRII içeren bir heterotetramer komplekstir (37).



Şekil 8: TGF β sinyalizasyon yolu

Tip 2 reseptörün tip 1 reseptörü fosforlamasıyla, tip 1 ve tip 2 reseptör kompleksleri başlatılır. Tip 2 reseptör çeşitli serin ve treonin rezidüleri üzerinde otofosforlanır. Tip 2 reseptör aktivitesi için Ser213 ve Ser409'un fosforilasyonu gerekir. Ser416'nın fosforilasyonu ise reseptör kinaz aktivitesine engel olmaktadır. Tip 2 reseptör aktiflendiğinde ve iki reseptör yakınlaşmayı bitirdiğinde, tip 1 reseptörün GS bölgesindeki serinler fosforlanır. Tip 2 reseptör tek başına sinyal iletmede yetersizken, tip 1 reseptörün fosforilasyonu intrasellüler sinyal kaskadını başlatmak için

yeterlidir. Ayrıca Ser165'in fosforilasyonu TGF β sinyalizasyonunu düzenleyebilir çünkü bu rezidünün mutasyonu TGF β indükleme yollarını farklı etkiler (37).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 18.01.2012 tarihli ve 2012-1-1 numaralı kararı onayıyla Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Deneylerde 45 adet gebe vahşi tip beyaz fare kullanıldı. Fareler aynı laboratuar şartlarında herhangi bir kısıtlayıcı veya özel koşul uygulanmaksızın takip edildi. Deneylerde embriyolar kullanılacağı için, dişi fareler erkek ile bir gece inkübe edildikten sonra ertesi sabah vajinal plug saptananlar gebe olarak ayrılarak izleme alındı. Fareler randomize edilerek toplam 9 gruba ayrıldı.

3.2. İmmünohistokimyasal Tanımlama

Bu aşamada üreterin farklı zaman dilimlerindeki özelliklerini gösterebilmek için; üreterin belirginleştiği ve mikroskop altında diseke edilebilir hal aldığı 16. embriyonik günden beş gebe, 18. günden beş gebe, 20. günden beş gebe fare alınırken ve 5 gebe farenin postnatal 1. günden yenidoğan yavruları alındı.

Alınan örneklerin üriner sistemleri mikroskop altında diseke edildi ve distal üreter mesane dokusu da içerecek şekilde toplandı. İmmunohistokimyasal inceleme için kültüre edilmiş organlar %4'lük paraformadehitle fiksasyonu takiben parafin bloklara gömüldü. Bloklardan alınan 4 μm kalınlıktaki kesitler histolojik değerlendirme için, deparafinize ve rehidrate edildi. Farklı dönemlerde toplanan dokular 1/50 oranında seyreltilmiş anti-TGF-β ve anti-TGF-β reseptör 2 antikorları (Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, CA, ABD) ile boyandı. Boyanan preperatlar x40 büyütme altında pozitivite açısından incelendi.

3.3. Fonksiyonel Çalışma

Bu aşamada toplam 25 gebe fare 5 gruba randomize edilerek gebeliklerinin 16. gününde CO_2 ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen farelerden elde edilen embriyoların distal üreterleri mesane içerecek şekilde toplandı. Örnekler 5 farklı grup halinde Millicell (Millipore Corporation, Bedford, MA, ABD), "serum free" (DMEM/F12; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, ABD) doku kültürüne ekildi. Doku kültürüne 10 mg/L insülin, 5 ng/ml selenyum ve 5,5 mg/L transferrin eklenerek, hücreler 37 °C'de %5 CO2'li ortamda inkübe edildiler. Antibiyotik veya fetal calf serumu büyümeyi engelleyebileceği için kültüre eklenmedi.

1. grubun organ kültürüne 2 ng/mL bioaktif TGF-β (Sigma Aldrich, St Louis, MO, ABD), 2. grubun organ kültürüne 20 ng/mL TGF-β eklendi. 3. gruba 20 ng/mL TGF-β ile beraber çözünebilir TGF-β reseptörü (Sigma Aldrich, St Louis, MO, ABD) eklendi. 4. gruba tek başına TGF-β reseptörü eklendi. 5. grup kontrol grubu olarak organ kültürüne ekildi. Kültüre edilmiş üreterler 7. günde analiz için toplandı.

3.4. İmmunohistokimyasal İnceleme

Kültüre edilen organlarda total protein ölçümü BCA protein assay iel yapıldı ve DNA ölçümü yapıldı. Her iki assay yöntem sırasında bir örnek oluşturmak için 10'ar üreter havuzlandı.

İmmunohistokimyasal inceleme için kültüre edilmiş organlar %4'lük paraformadehitle fiksasyonu takiben parafin bloklara gömüldü. Bloklardan

alınan 4 µm kalınlıktaki kesitler histolojik değerlendirme için, deparafinize ve rehidrate edildi.

İmmünhistokimyasal inceleme için İmmünhistokimyasal inceleme Streptavidin- Biotin Kompleks metodu kullanılarak otomatik immünhistokimyasal boyama makinesiyle yapıldı ve CD 31, üreteryal Ki67 ve musküler Ki67 ekspresyonu değerlendirildi (1/50, ABCAM).

Mikro Damar Yoğunluğu (MDY) ölçümünde her organ için x40 büyütmede en kuvvetli CD 31 pozitif alan seçildi. Belirlenen bölgelerde x200 büyütmede CD 31 pozitif endotel hücreleri 10 alanda sayılarak ortalamaları alındı. Her örnek için bu ortalama değerler MDY olarak kaydedildi. Ki67 için boyanma yaygınlığı değerlendirilirken toplam 200 hücre sayılarak pozitif boyanan nükleusların yüzdesi tespit edildi.

3.5. Flowsitometri

Flow sitometrik inceleme için her gruptan 3 veya 4 organ havuzlandı. Hücreler arası bağları koparmak amacıyla örnekler 30 dakika boyunca 37 °C sıcaklıkta 1,4 g/L kollagenaz A, 4g/L dispaz ve 0,1 g/L DNase1 içeren ortamda bekletildi. Santifüjleme sonrası hücre çökeltisine 1 ml DMEM/F12 eklendi ve tripan mavi boyanmasını takiben kullanılabilir hücreler elde edildi. Hücreler 1 ml FACS tamponu (%5 fetal calf serum, PBS, %0,02 sodyum azid) eklenerek 300 G'de 5 dakika santrifüje edildi. 200 µL hücre süspansiyonu alınarak üzerine Anti-SMA FITC eklendi. Hücreler 4 ºC'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 3 defa yıkanan hücrelerin üzerine 0,5 ml PBS eklenerek ve flow sitometri çalışması yapıldı (Facscalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, ABD).

3.6. İstatiksel Analiz

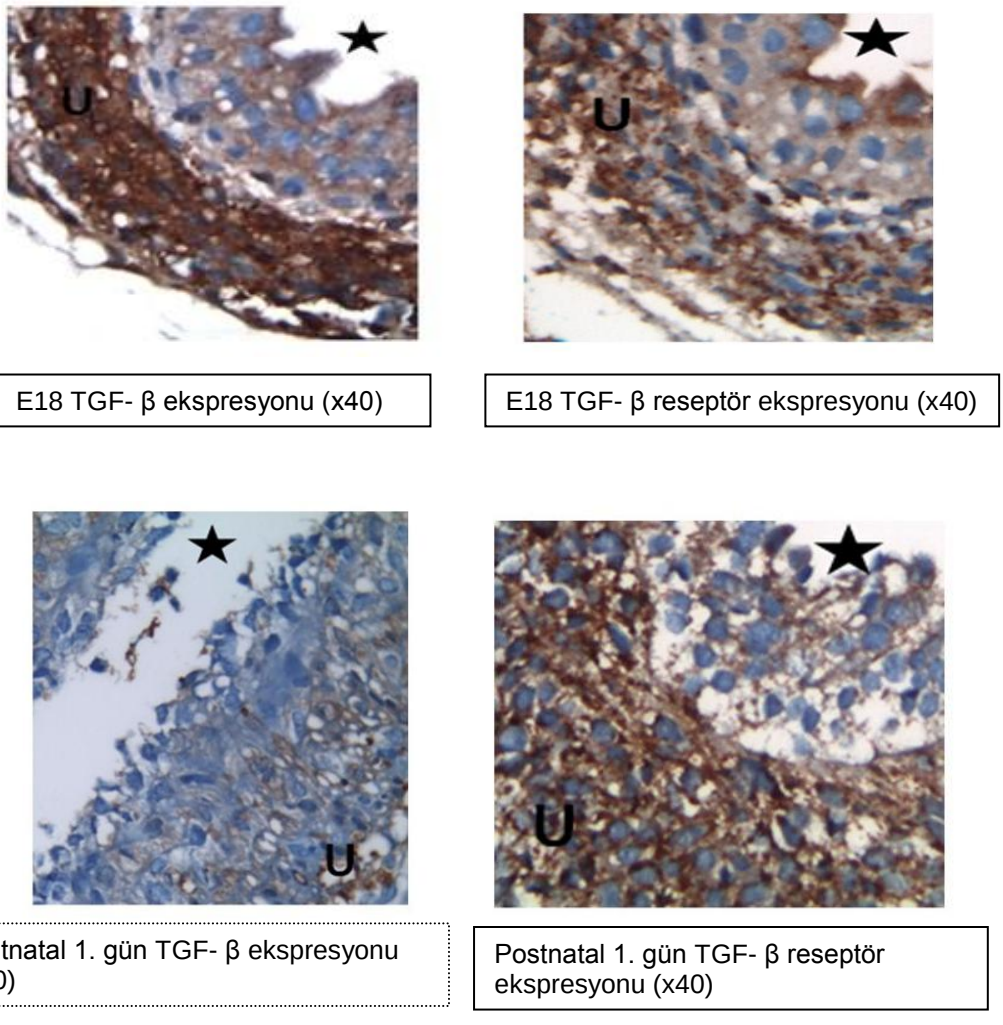
Verilerin analizi SPSS for Windows 15 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler dağılımı normal olan değişkenler için ortalama ± standart sapma, dağılımı normal olmayan değişkenler için median(min – maks), nominal değişkenler ise vaka sayısı ve (%) olarak gösterilmiştir.

Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği dağılım normal olduğu için varyans analizi (one way ANOVA) yöntemi ile araştırıldı. Farklılık çıkan değişkenlerin ikili karşılaştırmaları için post hoc test bonferroni kullanıldı.

$p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmanın tanımlayıcı kısmında öneklenen bütün embriyonik günlerde (E16,E18,E20,Postnatal 1) embriyonik üreterlerde TGF-β ve TGF- β reseptör 2 immunolojik boyanmada saptandı. Yapılan değerlendirmede TGF-β ekspresyonun 18. embriyonik günde en yüksek seviyeye ulaştığı sonrasında ise azalmaya başladığı saptandı. TGF- β pozitif boyanmanın en düşük olduğu gün ise postnatal 1. gün olarak saptandı (şekil 9).



E18 TGF- β ekspresyonu (x40)

E18 TGF- β reseptör ekspresyonu (x40)

Postnatal 1. gün TGF- β ekspresyonu (x40)

Postnatal 1. gün TGF- β reseptör ekspresyonu (x40)

Şekil 9: Ebryonik 18. günde ve postnatal 1. günde alınan distal üreterlerdeki TGF- β ve TGF- β reseptör ekspresyonu

★ üreter lümeni
U üreter

Tablo 1: Gruplara göre CD31, Ki67 (üretelyal/musküler) ve anti-SMA flowsitometri pozitif hücre yüzdeleri

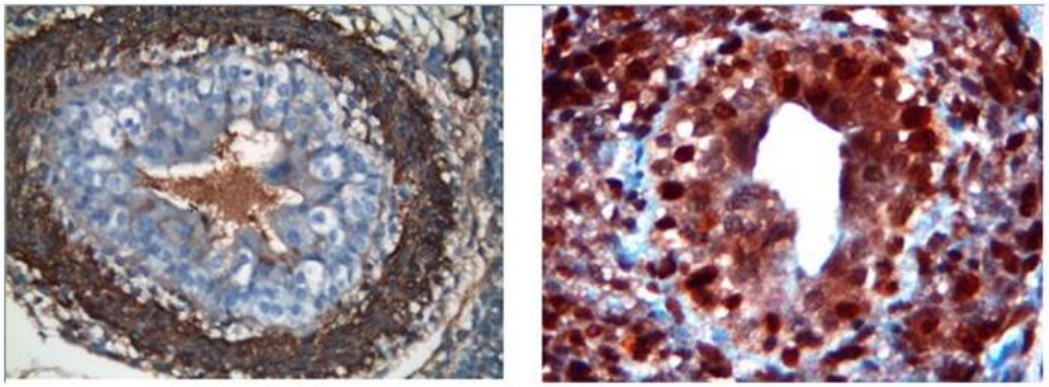
		N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	P değeri
					Lower Bound	Upper Bound			
CD31	1	5	2,49	0,07	2,40	2,58	2,41	2,59	P<0,001
	2	5	2,18	0,07	2,09	2,27	2,09	2,28	
	3	5	3,22	0,08	3,12	3,33	3,11	3,31	
	4	5	3,21	0,09	3,10	3,32	3,12	3,32	
	5	5	3,28	0,16	3,08	3,48	3,08	3,47	
Ki67uretelyal	1	5	22,70	0,58	21,98	23,42	21,90	23,50	P<0,001
	2	5	21,06	0,52	20,42	21,70	20,40	21,80	
	3	5	24,96	0,71	24,08	25,84	24,10	25,60	
	4	5	24,64	1,04	23,35	25,93	23,10	25,90	
	5	5	25,22	0,93	24,06	26,38	23,90	26,20	
Ki67muskuler	1	5	15,76	0,30	15,39	16,13	15,30	16,10	P<0,001
	2	5	14,42	0,34	14,00	14,84	13,90	14,80	
	3	5	18,08	0,33	17,66	18,50	17,70	18,60	
	4	5	17,82	0,62	17,05	18,59	16,90	18,40	
	5	5	18,26	0,47	17,67	18,85	17,80	18,90	
flowsitometri Anti-SMA	1	5	9,04	0,56	8,35	9,73	8,40	9,80	P<0,001
	2	5	7,94	0,30	7,56	8,32	7,50	8,30	
	3	5	10,58	0,45	10,02	11,14	10,10	11,10	
	4	5	10,46	0,45	9,90	11,02	9,70	10,90	
	5	5	10,78	0,47	10,20	11,36	10,20	11,30	

Çalışmanın fonksiyonel kısmında ekzojen TGF- β'nın doku kültürüne ekilen üreterler üzerine etkisini araştırdık. Bu amaçla distal üreterler doku kültürüne ekildi ve 5 gruba ayrıldı. Grup 1'e 2 ng/mL TGF- β, Grup 2'ye 20 ng/ml TGF- β, Grup 3'e 20 ng/mL TGF- β ile beraber TGF- β reseptörü, Grup 4'e ise sadece 20 ng/ml TGF- β reseptörü eklendi. Dokular 7 gün sonra toplandı.

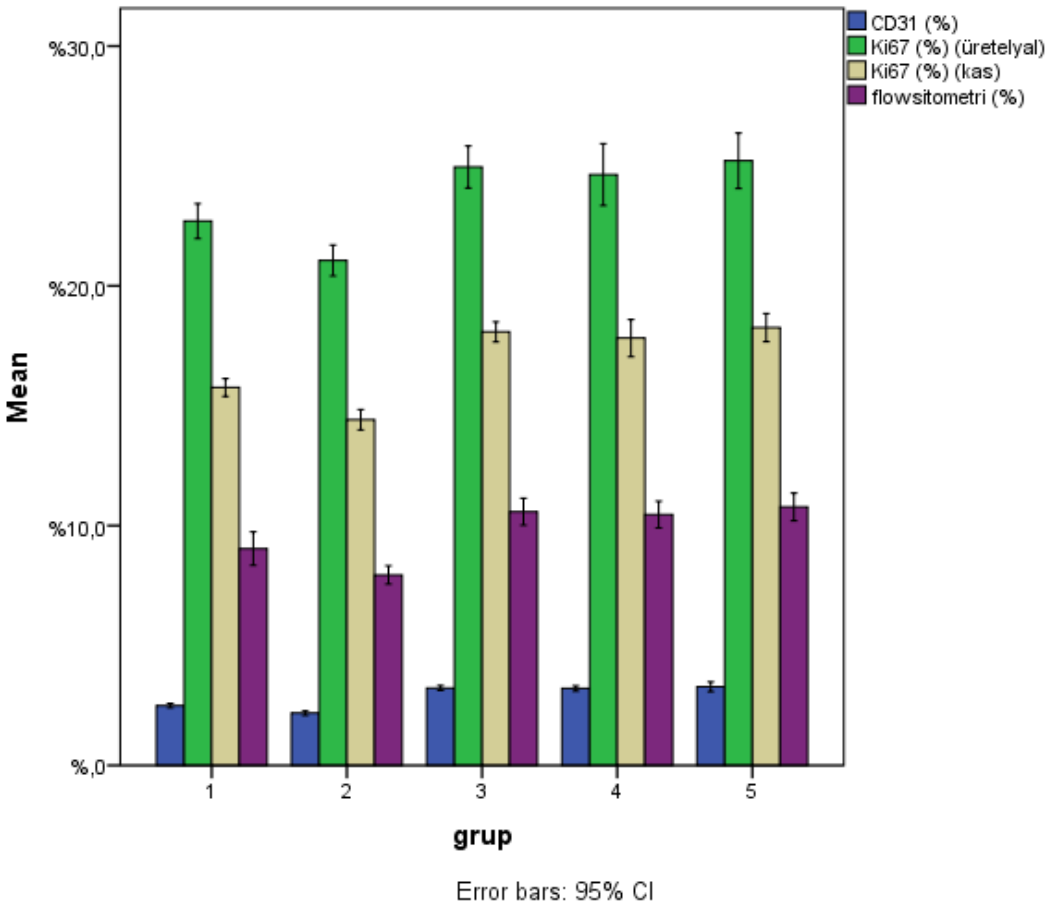
Üreterlerdeki kas formasyonunu incelemek amacıyla ilk olarak kontrol grubunda olmak üzere tüm gruplarda yapılan boyamalarla CD31, Ki67 ve anti-SMA pozitifliği bakılmış ve yüzdeleri hesaplanmıştır (tablo 1). Tablo 1'de gruplara göre minimum, maksimum ve ortalama CD31, Ki67 üretelyal, Ki67 musküler ve anti-SMA değerleri verilmektedir (şekil 11). Bakılan bu parametrelerde gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$) (tablo 2).

Tablo 2: CD31, Ki67 (üretelyal/musküler) ve anti-SMA flowsitometri sonuçlarının gruplara arası karşılaştırılması

CD31																					
(I) grup		1				2				3				4				5			
(J) grup		2	3	4	5	1	3	4	5	1	2	4	5	1	2	3	5	1	2	3	4
Mean Difference (I-J)		0,312*	-0,73	-0,72	-0,79	-0,03	-1,04	-1,03	-1,10	0,73	1,04	0,02	-0,06	0,72	1,03	-0,02	-0,07	0,79	1,10	0,06	0,07
p değeri		**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	1,00	1,00	**0,00**	**0,00**	1,00	1,00	**0,00**	**0,00**	1,00	1,00
95% Confidence Interval	Lower Bound	0,11	-0,94	-0,92	-0,99	-0,52	-1,25	-1,23	-1,30	0,53	0,84	-0,19	-0,26	0,51	0,82	-0,22	-0,28	0,58	0,90	-0,15	-0,13
	Upper Bound	0,52	-0,53	-0,51	-0,58	-0,11	-0,84	-0,82	-0,90	0,94	1,25	0,22	0,15	0,92	1,23	0,19	0,13	0,99	1,30	0,26	0,28
Ki67uretelyal																					
(I) grup		1				2				3				4				5			
(J) grup		2	3	4	5	1	3	4	5	1	2	4	5	1	2	3	5	1	2	3	4
Mean Difference (I-J)		1,64	-2,20	-1,94	-2,52	-1,64	-3,90	-3,58	-4,16	2,26	3,90	0,32	-0,26	1,94	3,58*	-0,32	-0,58	2,52	4,16	0,26	0,58
p değeri		**0,03**	**0,00**	**0,01**	**0,00**	**0,03**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	1,00	1,00	**0,01**	**0,00**	1,00	1,00	**0,00**	**0,00**	1,00	1,00
95% Confidence Interval	Lower Bound	0,08	-3,82	-3,50	-4,08	-3,20	-5,46	-5,14	-5,72	0,70	2,34	-1,24	-1,82	0,38	2,02	-1,88	-2,14	0,96	2,60	-1,30	-0,98
	Upper Bound	3,20	-0,70	-0,38	-0,96	-0,08	-2,34	-2,02	-2,60	3,82	5,46	1,88	1,30	3,50	5,14	1,24	0,98	4,08	5,72	1,82	2,14
Ki67muskuler																					
(I) grup		1				2				3				4				5			
(J) grup		2	3	4	5	1	3	4	5	1	2	4	5	1	2	3	5	1	2	3	4
Mean Difference (I-J)		1,34	-2,32	-2,06	-2,50	-1,34	-3,66	-3,40	-3,84	2,32	3,66	0,26	-0,18	2,06	3,40	-0,26	-0,44	2,50	3,84	0,18	0,44
p değeri		**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	1,00	1,00	**0,00**	**0,00**	1,00	1,00	**0,00**	**0,00**	1,00	1,00
95% Confidence Interval	Lower Bound	0,48	-3,18	-2,92	-3,36	-2,20	-4,52	-4,26	-4,70	1,46	2,80	-0,60	-1,04	1,20	2,54	-1,12	-1,30	1,64	2,98	-0,68	-0,42
	Upper Bound	2,20	-1,46	-1,20	-1,64	-0,48	-2,80	-2,54	-2,98	3,18	4,52	1,12	0,68	2,92	4,26	0,60	0,42	3,36	4,70	1,04	1,30
flowsitometri																					
(I) grup		1				2				3				4				5			
(J) grup		2	3	4	5	1	3	4	5	1	2	4	5	1	2	3	5	1	2	3	4
Mean Difference (I-J)		1,10	-1,54	-1,42	-1,74	-1,10	-2,64	-2,52	-2,84	1,54	2,64	0,12	-0,20	1,42	2,52	-0,12	-0,32	1,74	2,84	0,20	0,32
p değeri		**0,01**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,01**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	1,00	1,00	**0,00**	**0,00**	1,00	1,00	**0,00**	**0,00**	1,00	1,00
95% Confidence Interval	Lower Bound	0,19	-2,45	-2,33	-2,65	-2,01	-3,55	-3,43	-3,75	0,63	1,73	-0,79	-1,11	0,51	1,61	-1,03	-1,23	0,83	1,93	-0,71	-0,59
	Upper Bound	2,01	-0,63	-0,51	-0,83	-0,19	-1,73	-1,61	-1,93	2,45	3,55	1,03	0,71	2,33	3,43	0,79	0,59	2,65	3,75	1,11	1,23

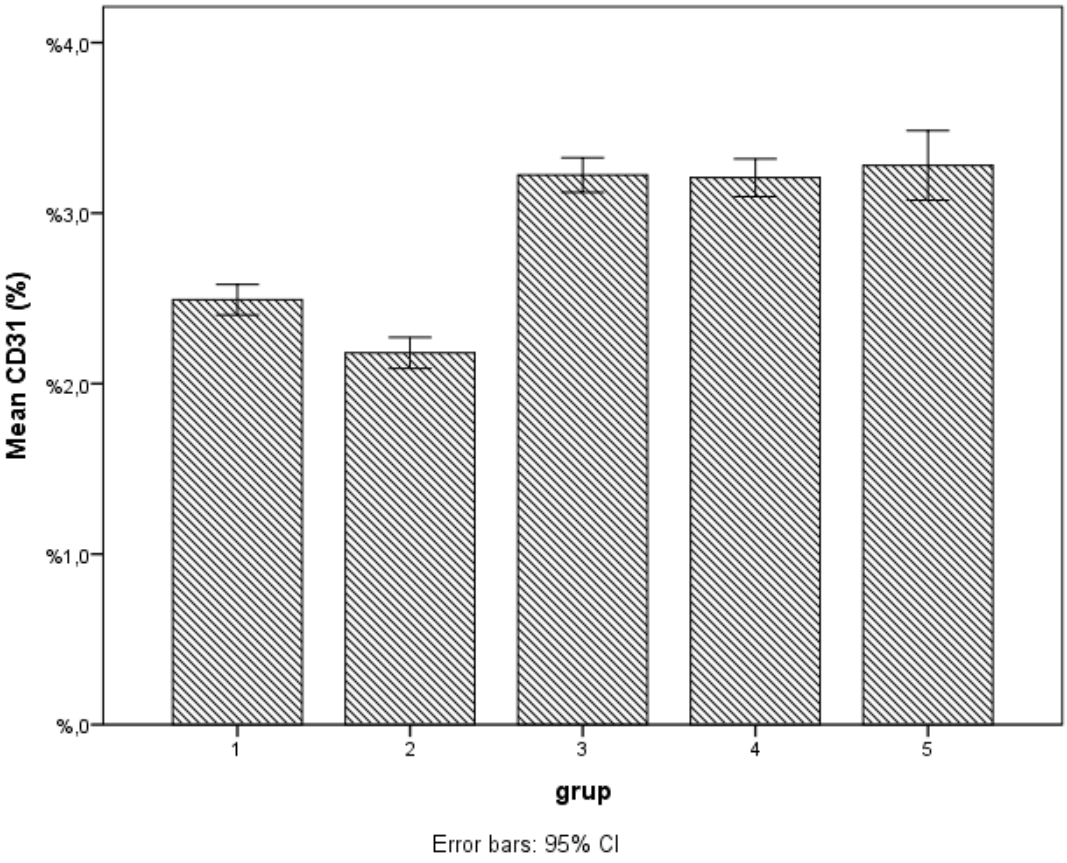


Şekil 10: Organ kültürüne ekilmiş üreterlerde SMA ve Ki67 ekspresyonu



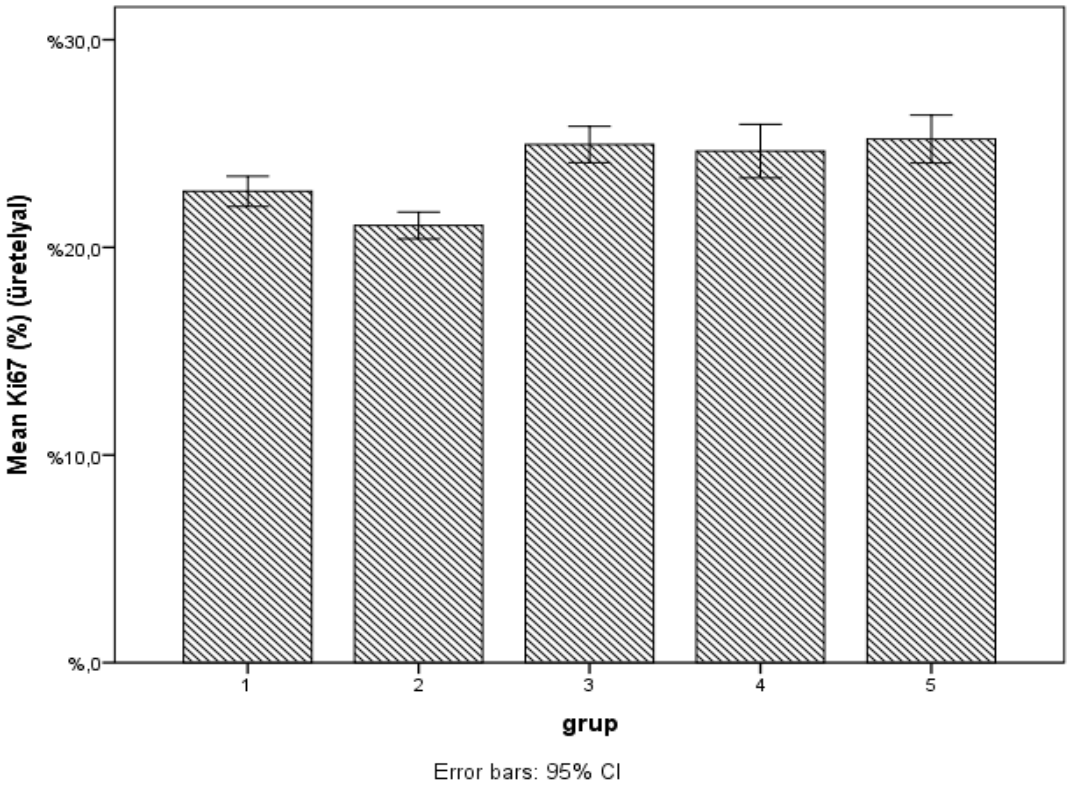
Şekil 11: Gruplara göre CD31, Ki 67 üretelyal/musküler ve flowsitometrik SMA değerleri

İmmunohistokimyasal incelemede CD31 ekspresyonuna bakıldığında Mikro damar yoğunluğu (MDY) açısından en yüksek değer kontrol grubunda saptanırken (%3,28), en düşük pozitiflik ise 20 ng/mL TGF- β eklenen grup 2'de görüldü (%2,18).diğer gruplardaki ortalama CD31 yüzdeleri sırasıyla %2,49, %3,22 ve %3,21 olarak hesaplandı. Yapılan tek değişkenli analizde ekzojen TGF- β eklenen gruplardaki pozitivite yüzdeleri diğer gruplardan anlamlı olarak düşükken (p<0,05), grup 3,4 ve 5 arasında anlamlı fark saptanmadı (p>0,05) (şekil 12).

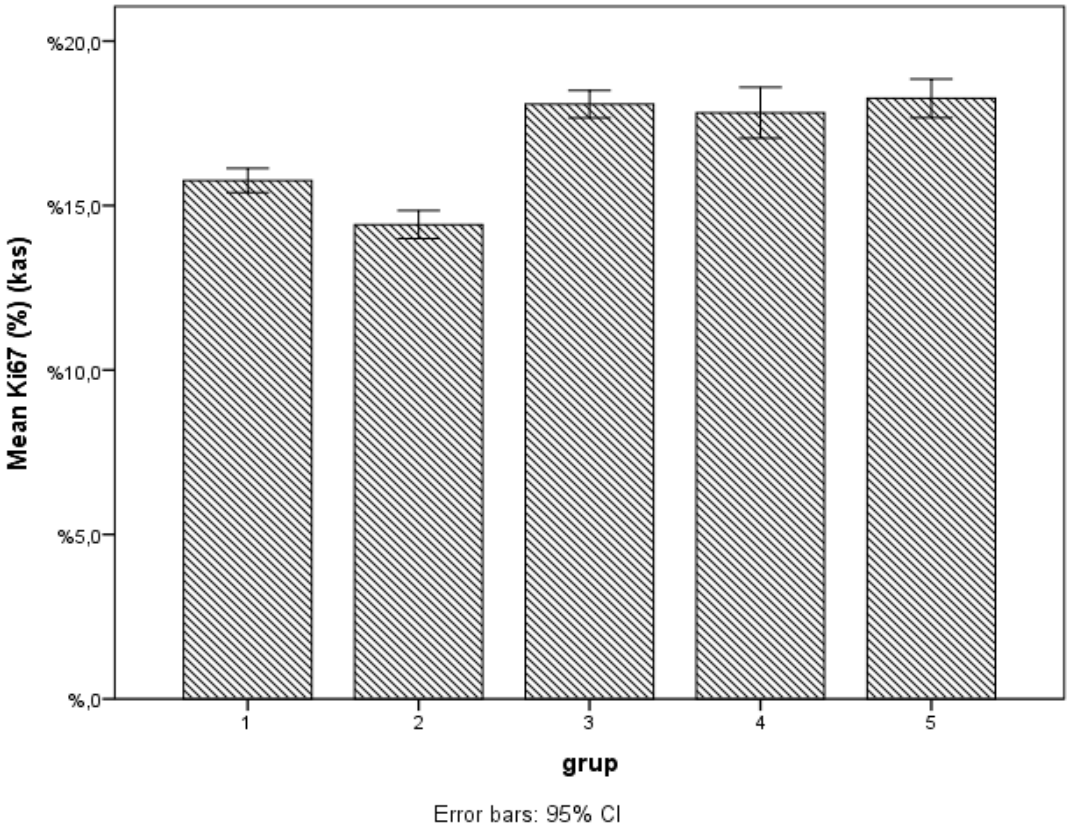


Şekil 12: Gruplara göre CD31 değerleri

Ki67 bütün gruplarda üretelyal ve muskuler olmak üzere bakıldı. Her iki alt tipde de grup1 ve 2 diğer gruplardan istatistiksel anlamlı olarak daha az boyanırken, diğer 3 grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p>0,05). Grup 2'deki Ki67 üretelyal ve kas boyanması grup 1'den daha düşüktü (p<0,05) (şekil 13,14).



Şekil 13: Gruplara göre üretelyal Ki67 değerleri



Şekil 14: Gruplara göre musküler Ki67 değerleri

BCA protein assay yöntemi ile örneklerdeki total protein ve DNA değerleri ölçüldü. Bu değerler grup 3,4 ve 5'te benzer iken grup 1 ve 2'de istatistiksel anlamlı olarak daha düşük saptandı ($p<0,05$) (tablo 3).

Tablo 3: Gruplara göre total protein ve DNA içeriği

Gruplar	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Protein (μg)	2,912	2,635	3,387	3,256	3,548
DNA (μg)	0,161	0,149	0,202	0,195	0,214

5. TARTIŞMA

Megaüreter terimi dilate üreter anlamına gelmektedir. Çocuklarda üreter çapı nadiren 5 mm'nin üzerine çıkmaktadır ve 7 mm'den daha geniş üreterler megaüreter olarak tanımlanmaktadır (7). Megaüreter terimi tek bir patolojik durumu içermeyip, bir grup patolojik ve parafizyolojik durumu tanımlamaktadır.

İlk sınıflama 1796 yılında Smith tarafından yapılmıştır ve sonrasına 1980 yılında King tarafından modifiye edilmiştir (8). Megaüreterler obstrüktif, reflüksif, nonobstrüktif-nonreflüksif, hem obstrüktif hem reflüksif olarak 4 gruba ayrılır. Her grup kendi içinde primer ve sekonder olmak üzere de iki başlığa ayrılır. Sekonder megaüreterin sık görülen nedenleri enfeksiyonlar, diabetes insipitus, external obstrüksiyon, nöropatik mesane ve posterior üretral valvlerdir.

Primer megaüreter neonatal dönemde görülen obstrüktif üropatinin sık görülen nedenlerinden biridir. Antenatal dönemde US kullanımının yaygınlaşması ile görülme sıklığı giderek artmaktadır.

Primer megaüreterin etyolojisi halen net olarak anlaşılamamıştır. Hastaların büyük çoğunluğunda gerçek bir obstrüksiyon olmaksızın distal üreterde üreterovezikal bileşkeye yakın 0,5-4 cm uzunluğunda adinamik bir segmentin varlığına bağlı olarak idrar akışı bozulmakta ve obstrüktif semptomlar görülmektedir. Caulk(1923) ve Swenson (1952) bu hastalığın, distal üreterde intramural sinir ganglionu yokluğuna bağlı olarak gelişebileceğini öne sürmüşlerdir. Fakat hastalardan alınan örneklerin incelenmesiyle normal ganglion yapısının varlığı saptanmıştır (17).

Takip eden yıllarda çalışmalar adinamik segment üzerine yoğunlaşmıştır. Tanagho ve arkadaşları otopsi serisinde kas liflerinin longitudinal yerine sirküler oryantasyonu göstermişlerdir ve obstrüksiyon derecesinin sirküler kas lifi sayısıyla korele olduğunu saptamışlardır(39).

Gregoir ve Debled 30 primer megaüreter hastasından aldıkları distal üreterleri incelemişler ve fonksiyonel obstrüktif segmenti 4 kategoriye ayırmışlardır: 1) distal üreterin terminal 3-4 cm'sinde yoğun kollajen infiltrasyonu (%60), 2) üreter orifisinde sirküler kas hipertrofisi, 3) fibroepitelyal embryonal displazi 4) komplet embryonal displazi (40).

Mclaughlin ve arkadaşları 32 obstrükte üreter segmentini incelemişler ve bulguları yine 4 kategoride toplamışlardır: 1) normal üreterler (5vaka), 2)kas liflerinin anormal oryantasyonu (2 vaka), 3) az sayıda kas lifi varlığı veya kas lifi olmaksızın mural fibrozis (3 vaka), 4) fibrozise bağlı olarak geniş bir alana yayılmış kas atrofisi (41).

Dixon ve ark. olası farklı bir etyolojinin altını çizmişlerdir (42). Üç primer obstrükte ektopik megaüreter vakasını içeren çalışmalarında distal üretrein yoğun bir kas lifi tabakası tarafından çevrelendiğini saptamışlardır. Bu kas tabakasında yoğun noradrenerjik innervasyon saptamışlardır ve bu yapının idrar akışına engel olabileceğini belirtmişlerdir.

Segmental değişiklikler farklı yazarlar tarafından da incelenmiş ve adinamik segmetteki perinatal üreterlere benzer şekilde; longitudinal kas liflerinde düzensizlik ve hipoplastik hücre demetleri saptanmıştır (43-45). Bu durumun küçük yaştaki çocuklarda olası spontan çözülmeyi açıklayabileceği belirtilmiştir. Megaüreterin; olası terminal üreter maturasyon gecikmesine bağlı oluşabileceği vurgulanmıştır.

Nicotina ve ark. TGF-β'nın primer megaüreter etyolojisindeki rolünü araştırmışlardır (46). Çalışmalarında primer megaüreter nedeniyle cerrahi operasyon uygulanan 17 (yaşları 6 ay ile 8 yaş arasıdna değişen, ortalama yaş 2,1 yıl) çocuğun distal üreterlerini incelemişlerdir. Bu üreterlerdeki histopatolojik değişikleri 11 haftalık insan fetusu ve 11-38 haftalık inek fetusu üreteleri ile karşılaştırmışlardır. Primer megaüreter olgularının üreterlerinde iç kas tabakası istatistiksel anlamlı daha ince saptanmış. Düz kas lifleri düzensiz olarak izlenirken interstisyel matriksin daha az olduğu görülmüş. 2 yaşından sonra rezeke edilen üreterlerde kronik inflamatuar değişiklikler

izlenmiş. 11-20 haftalık inek embriyolarına ait üreterlerde farklılaşmamış tek sirküler kas tabakası izlenmiştir. Gestasyonun 26-28. haftalarında ise bu tek tabakanın farklılaşarak içerde longitudinal dışarda ise sirküler kas lifleri olacak şekilde organize olduğunu saptamışlardır. İnek üreterlerinin immunohistokimyasal incelemesinde TGF-β en erken gestasyonun 11. haftasında saptanmıştır. TGF-β aktivitesi gestasyonun 28. haftasından itibaren hızlı bir şekilde gerilemiştir ve termde saptanamaz seviyelere inmiştir. Alınan distal üreter örneklerinde dilate ve dar segment ayrı ayrı incelenmiştir ve dilate segmentlerde TGF-β boyanması saptanmazken 2 yaşına kadar olan tüm hastaların dar segmentlerinde TGF-β boyanması saptanmıştır.. Hastalardan alınan üreterlerdeki TGF-β pozitif hücre yüzdesi %44,8 iken 20-26 haftalık fetuslardaki TGF-β pozitif hücre yüzdesi ise %52,1 olarak saptanmıştır ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. 2 aşın üzerindeki hiçbir hastada ise immunohistokimayasal olarka TGF-β saptanmamıştır. Çalışma sonucunda TGF-β'nın üreter gelişiminde segmental gelişme geriliğine yol açtığı belirtilmiştir.

TGF-β'nın embriyonik mezoderm farklılaşmasındaki rolü bilinmektedir. TGF-β kas hücre öncülerinin büyümesini ve myogenezisi düzenler, kas hücre farklılaşmasını geciktirir (47-52). Massague ve arkadaşları (53) 1986 yılında yaptıkları çalışmada TGF-β'nın iskelet kası myoblastlarının farklılaşması üzerine etkilerini araşırmışlardır. Fare iskelet kası myoblastlarını hücre kültürüne ekmişler ve kültüre TGF-β eklemişlerdir. TGF-β'nın kas hücrelerinin füzyonunu engellediği saptanmıştır. Ayrıca TGF-β'nın biokimyasal farklılaşmayı da engellediğini bildirmişlerdir. Myojenik farklılaşma sırasında kas spesifik proteinlerin sentezlenmesini sağlayan mRNA seviyeleri artarken TGF-β eklenen kültürlerde bu seviyelerin artmadığını belirtmişlerdir. Benzer olarak farklılaşma süresince düzeyleri azalan β ve γ-aktin mRNA'ların TGF-β eklenen kültürlerde yüksek seviyelerde seyrettiğini belirtmişlerdir. Myojenik farklılaşmanın başka bir belirteci olan kreatin fosfokinaz aktivitesinin de TGF-β tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda TGF-β'nın

kas farklılaşmasında önemli bir modülatör olduğu ve kas farklılaşmasını olumsuz yönde etkilediği vurgulanmıştır.

TGF-β ekspresyonunun gestasyonun 11-20. haftalarında immunhistokimyasal olarak saptanabilir hale geldiği, 26. gebelik haftasından sonra hızlı bir şekilde düşmeye başladığı ve doğumda saptanamaz düzeylere kadar gerilediği gösterilmiştir. Primer megaüreter nedeniyle cerrahi operasyon yapılan hastaların distal üreterlerinde TGF-β ekspresyonunun saptanması, bu büyüme faktörünün primer megaüreter etyolojisinde rolü olduğunu düşündürmektedir. Aynı zamanda bu hipotez primer megaüreterin hayatın ilk 2 yılında kendiliğinden düzelmesini de açıklayabilir.

Biz çalışmamızda öncelikle fare üreterlerinde TGF-β ve TGF-β reseptörünü embriyonik ve postnatal 1. günde göstermeyi amaçladık. Takiben embriyonik 16. günde diseke edip kültüre ettiğimiz fare üreterlerinde TGF-β'nın etkisini araştırdık. Daha önceden yapılmış ve TGF-β'nın üreter gelişimi üzerine etkilerini gösteren çalışmalar bu çalışmaya öncülük etmiştir (46,48,51,52). Her ne kadar primer megaüreterin etyolojisi günümüzde de tam olarak anlaşılamamışsa da TGF-β'nın etyopatogenezdeki rolü birçok farklı çalışmada gösterilmiştir.

Embriyonik örnekleme yaptığımız tüm günlerde (E16, E18, E20) distal üreterlerde immunohistokimyasal olarak TGF-β ve TGF-β reseptörü 2 saptadık. Nicotina ve arkadaşlarının (46) çalışmasına benzer şekilde E18'de en yüksek değere ulaşan TGF-β pozitivitesi sonrasına gerilemeye başladı ve postnatal 1. gün alınan üreterlerde en düşük seviyeye ulaştı. Bu durum üreter maturasyonunda TGF-β'nın prenatal dönemde etkili olduğunu ve doğum sonrasında saptanmaması gerektiğini göstermiştir. Primer megaüreter nedeniyle cerrahi tedavi uygulanan hastaların distal üreterlerinde TGF-β saptanması da bu görüşü de desteklemektedir.

Çalışmanın fonksiyonel kısmında organ kültürüne sadece TGF-β eklenen gruplarda CD31 boyama ile MVD, Ki67 (üretelyal/musküler) ve

flowsitometride SMA pozitif hücre yüzdelerinin diğer gruplara göre düşük olması, ekzojen TGF-β'nın üreterlerdeki düz kas proliferasyonunu ve gelişimi olumsuz etkilediğini göstermektedir. Ekzojen TGF-β eklenen grublarda üreter gelişimi ve hücre proliferayonu gecikmiştir, mikroskobik incelemede ise longitudinal kas liflerinin belirgin olarak daha az olduğu saptanmıştır. Ekzojen TGF-β üreteral kas yapısını bozmakta ve üreterin gelişiminde gecikmeye neden olmaktadır. Bilindiği üzere üreterdeki kas yapısı gestasyonun erken haftalarında tek tabaka ve sirküler iken zamanla içeride longitudinal, dışarıda ise sirküler olmak üzere iki tabakalı bir yapıya dönüşmektedir. TGF-β varlığında longitudinal kas yapısının gelişmesi bozulmaktadır. Longitudinal kas yapısındaki bozulma üreter peristaltizmini olumsuz etkilemekte ve aperistaltik bir segmente neden olmaktadır. Aperistaltik segment anatomik bir darlık yaratmamakla birlikte idrar akışını engelleyerek fonksiyonel bir darlığa neden olmaktadır. Massague ve arkadaşlarının (53) yaptığı çalışmanın sonuçlarına benzer olarak TGF-β'nın myojenik farklılaşmayı inhibe ettiği düşünülmektedir. BCA protein assay yöntemi ile saptanan total protein ve DNA değerleri de bu tezi desteklemektedir. Üreter gelişimi ile birlikte artan kas yapısına bağlı olarak artması gereken total protein ve DNA değerleri TGF-β eklenen gruplarda kontrol grubuna göre daha az artmıştır. Bu veriler TGF-β'nın üreterdeki kas yapısını olumsuz etkldiğini göstermektedir.

TGF-β ile birlikte TGF-β reseptörü eklenen organ kültürlerinde bakılan parametrelerde kontrol grubuna göre fark olmaması, TGF-β reseptörünün TFG-β'nın etkilerini nötralize ettiğini düşündürmektedir. Tek başına TGF-β reseptörü eklenen grupta kontrol grubuna göre fark olmaması ise ortamda TGF-β olmamasına bağlanmıştır.

6. SONUÇ

Embriyonik üreterlerde TGF-β'nın E18. gün en yüksek seviyeye çıkması ve sonrasında gerilemesi, patolojik olarak yüksek devam eden TGF-β seviyelerinin megaüreter etyolojisinde yeri olduğunu gösterebilir. Ekzojen TGF-β eklenen organ kültürünlerinden elde edilen dokularda UVB düz kas proliferasyonun geciktiği ve bunun da kas yapısını etkilediği saptanmıştır.

Bu bulgular TGF- β'nın üreter matürasyonunda segmental gelişim gecikmesine sebep olduğunu göstermektedir ve primer megaüreter patogenezinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. TGF- β varlığında distal üreterde longitudinal kas gelişimi bozulmaktadır. Içerde longitudinal, dışarda ise sirküler kaslardan oluşan normal üreter yapısı yerine sirküler kasların ağırlıklı olduğu ve longitudinal kasların daha az görüldüğü bir yapı izlenmektedir. Bu yapının idrar akışı için çok önemli olan peristaltizme engel olan adinamik bir segmente neden olduğu düşünülmektedir. TGF- β'nın etkilerini tersinirdir. Doğumu takiben ilk 2 yılda megaüreter tablosunun spontan çözülmesi TGF- β gerilemesine bağlı olabilir.

ÖZET

TRANSFORMİNG BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN GELİŞEN EMBRYONİK ÜRETER ÜZERİNE ETKİSİ: FARELERDE İN-VİTRO MEGAÜRETER MODELİ

AMAÇ

Transforming büyüme faktör-β'nın megaüreter patogenezindeki rolü gösterilmiştir. TGF-β'nın patolojik olarak yüksek ekspresyonu alt üreterin gelişiminde gecikmeye neden olmaktadır. TGF-β değerlerinin zaman içinde azalması ile megaüreter spontan olarak düzelmektedir.

Biz bu çalışmada farelerde TGF-β ve TGF-β reseptörünün (TGFR) üreterovezikal bileşke (UVB) ve alt üreterdeki ekspresyon paternini belirlemeyi ve embryonic organ kültürü modelinde ekzojen TGF-β'nın düz kas gelişimi üzerindeki etkisini saptamayı hedefledik.

GEREÇ ve YÖNTEM

Farklı embryonic günlerde (E) (E16, 18,20, postnatal day 1,7) alt üreter ve UVB'deki TGF-β ve TGFR ekspresyonuna bakıldı. Fare embryolarının üretreleri E16. Günde toplandı ve organ kültürüne ekildi. Bazı kültürlere TGF-β (2&20 ng/ml) eklenirken bazı kültürlere ise TGF-β ile birlikte bioaktif blokör olarak TGFR de eklendi. 6 gün sonra organlar toplandı ve örneklerde immunohistokimyasal olarak CD31 ve Ki67 çalışıldı. Flowsitometri kullanılarak UVB'nin ve üreterin kas içeri analiz edildi.

BULGULAR

Embryonic üreterde immunolojik olarak TGF-β ve TGFR2 pozitif hücreler saptandı. TGF-β ekspresyonun E18'de en yüksek seviyeye çıktığı ve postnatal dönemde gerilediği görüldü. Ekzojen TGF-β'nın UVB'deki kas proliferasyonunu ve farklılaşmayı olumsuz etkilediği saptandı. TGF-β eklenen

kültürlerdeki longitudinal kas lifleri belirgin azdı. Ayrıca TGF-β'nın SMA ekspresyonunda da azalmaya neden olduğu görüldü. TGFR TGF-β'nın u etkilerini bloke etti.

SONUÇ

Ekzojen TGF-β eklenen organ kültürünlerinden elde edilen dokularda UVB düz kas proliferasyonun geciktiği ve bunun da kas yapısını etkilediği saptanmıştır. TGF-β'nın E18. gün en yüksek seviyeye çıkması ve sonrasıda postnatal olarak gerilemesi, patolojik olarak yüksek seviyelerin devam etmesinin primer megaüreter patogenezinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

SUMMARY

EFFECTS OF TRANSFORMING BÜYÜME FACTOR ON THE DEVELOPING EMBRYONIC URETER: AN IN-VITRO MEGAURETER MODEL IN MICE.

OBJECTIVES:

It has been shown that segmantal up-regulation of transforming büyüme factor beta (TGF-β) has a role in the pathogenesis of megaureter. The developmental delay of the lower ureter had been shown to be associated with the pathogenic autocrine TGF-β overexpression in limited number of human fetuses. The spontaneous resolution of megaureters had been postulated with the late regression of sustained TGF-β. We aimed to determine whether TGF-β and its receptors (TGFR's) are expressed during ureterovesical junction (UVJ) and lower ureter development in mice and whether exogenous TGF-β might postpone the maturation of smooth muscle cells, using an embryonic organ-culture model.

MATERIALS AND METHODS:

Expression of TGF-β&TGFR's on the lower ureter and UVJ were determined at different embryonic days (E) (E16,18,20;Postnatal Day1,7). The functional studies were performed by harvesting ureters from wild-type mice,at embryonic day (E) 16, were grown in serum-free organ-culture; some cultures were supplemented with TGF-β(2&20 ng/ml) and/or with soluble TGFR, which blocks bioactivity. Organs were harvested after 6 days and the expression of CD31 and Ki67 were assessed using immunohistochemistry. The muscle content of the UVJ and ureter were analyzed by flowcytometry.

RESULTS:

TGF-β & TGFR2 positive cells were immunodetected in embryonic ureters. The TGF-β expression was highest on E18 and had decreased

postnataly. Exogenous TGF-β decreased ureterovesical (UV) muscle differentiation and proliferation. The longitudinal muscle fibers were significantly less in TGF-β explants. TGF-β also decreased the proportions of cells expressing SMA. SolubleTGFR blocked the effects of exogenous TGF-β.

CONCLUSIONS:

In organ-culture, exogenous TGF-β postpones the UV smooth muscle proliferation and affects the muscular structure. Whether the effects of TGF-β are direct or indirect these form an invitro-megaureter model. The finding that TGF-β is highest in embryonic ureters in-vivo and decreases postnataly, suggests that a pathological persistance might potentialy explain the pathogenesis of primary megaureters.

KAYNAKLAR

1. Sadler TW. Urogenital system. In: Langman's Medical Embriyology. Williams and Wilkins Baltmore. 9th ed. 2004:321-362

2. Moore KL, Persaud TVN. The urogenital system. In: The Developing Human. Clinically oriented embryology. Saunders. Philedephia 7th ed. 2003: 287-328

3. Larsen WJ. Development of the urogenital system. In: Human Embryolgy. Churchill Livingstone. Philadelphia. 3rd ed. 2001:265-313

4. Walsh C. Campbell Üroloji 8.Baskı. Güneş Tıp Kitabevi, 2005:1748-1749.

5. Moore KL, Persaud TVN. The urogenital system. In: The Developing Human. Clinically oriented embryology. Saunders. Philedephia 7th ed. 2003: 287-328

6. Larsen WJ. Development of the urogenital system. In: Human Embryolgy. Churchill Livingstone. Philadelphia. 3rd ed. 2001:265-313

7. Hellstrom M, Hjalmas K, Jacobsson B, et al. Normal ureteral diameter in infancy and childhood. Acta Radiol 1985; 26:433-9

8. King LR. Megaloureter: Definition, diagnosis and management. J Urol 1980; 123:222-3

9. Hodges SJ, Werle D, McLorie G, Atala A. Megaureter.ScientificWorldJournal. 2010 Apr 13;10:603-12

10. Antenatal hydronephrosis: differential diagnosis, evaluation, and treatment options. Herndon CD. ScientificWorldJournal. 2006 Mar 5;6:2345-65

11. Tanagho EA. Intrauterine fetal ureteral obstruction. J Urol 1973; 109:196-203

12. MacKinnon KC. Primary megaureter. Birth Defects 1977; 13:15-6

13. McLaughlin AP, Pfister RC, Leadbetter WF, et al. The pathophysiology of primary megaloureter. J Urol 1973; 109:805-11

14. Pagano P, Passerini G. Primary obstructed megaureter. Br J Urol 1977; 49:469-75

15. Hanna MK, Jeffs RD, Sturgess JM et al. Ureteral structure and ultrastructure: Part 2. Congenital ureteropelvic junction obstruction and primary obstructive megaureter. J Urol 1976; 116:725-30

16. Walsh C. Campbell Üroloji 8.Baskı. Güneş Tıp Kitabevi, 2005:2097-3005.

17. Simoni F, Vino L, Pizzini C et al. Megaureter: classification, pathophysiology, and management. Pediatr Med Chir. 2000;22(1):15-24.

18. Keating MA, Escala J, Snyder HM 3rd et al. Changing concepts in management of primary obstructive megaureter. J Urol. 1989 Aug;142(2 Pt 2):636-40

19. Baskin LS, Zderic ZA, Snyder HM, et al. Primary dilated megaureter: Long-term follow up. J Urol 1994b; 152:618-21

20. Escala JM, Keating MA,Boyd G, et al. Development of elastic fibers in the upper urinary tract. J Urol 1989; 141:969-73.

21. Khoury, A. and Bagli, D. (2007) Reflux and megaureter. In *Campbell-Walsh Urology*. 9th ed. Wein, A.J. et al., Eds. WB Saunders, Philadelphia; 3423-3467

22. Keating MA. A different perspective of the perinatal primary megaureter. In Kramer SA: Problems in Urology. Philadelphia, JBLippincott, 1990, p 583-97

23. Keating MA, Duckett JW: Prune Belly Syndrome. In Ashcraft KW, Holder TM: Pediatric Surgery. Philadelphia, WB Saunders, 1993,p 721-26.

24. Weiss RM, Lytton B. Vesicoureteral reflux and distal ureteral obstruction. J Urol 101; 491-507

25. Shokeir AA, Nijman RJ. Primary megaureter: current trends in diagnosis and treatment. BJU Int 86; 861-868

26. Hendren WH: Operative repair of megaureter in children. J Urol, 101: 491-507, 1969.

27. Kalicinski ZH, Kansy J, Kotarbinska B, Joszt W: Surgery of megaureters--modification of Hendren's operation. J Pediatr Surg, 12: 183-188, 1977.

28. Starr A: Ureteral plication. A new concept in ureteral tailoring for megaureter. Invest Urol, 17: 153-158, 1979.

29. T. Oktar, O.Ziylan, Ö. Şanlı, N. Uluocak, İ. Nane, H. Ander. MGÜ Cerrahi tedavisinde 2 tekniğin değerlendirilmesi: Eksiyonel daraltmaStarr plikasyon Türk Üroloji Dergisi: 32 (4): 520-523, 2006

30. Siegel PM, Massague J, Cytostatic and apoptotic actions of TGF-Beta in homeostasis and cancer. Nat Rev Cancer, 2003; 3: 807-21.

31. Ikeguchi M, Iwamoto A, Taniguchi K et al. The gene expression level of transforming büyüme factor-beta (TGF-beta) as a biological prognostic marker of hepatocellular carcinoma. J Exp Clin Cancer Res, 2005; 24: 415-421.

32. Qi P, Ruan C, Wang H, Zhou F, Zhao Y, Gu X et al. 509C>T Polymorphism in the TGF-β1 gene promoter is not associated with

susceptibility to and progression of colorectal cancer in Chinese. 2009. Colorectal Dis. 2010 Nov;12(11):1153-8

33. Fujii, D., Brissenden, J. E., Derynck, R., Francke, U., “Transforming büyüme factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7”, *Somat. Cell. Mol. Genet.*, 12: 281-8 (1986).

34. Li T, Cao BW, Dai Y, Cui H, Yang HL, Xu CQ. Correlation of transforming büyüme factor beta-1 gene polymorphisms c-509t and t869c and risk of gastric cancer in China. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2008; 23: 638-642.

35. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-β signaling in tumor suppression and canser progression. Nat Genet, 2001; 29: 117-29.

36. Vural P, Transforming büyüme factor β’ nın kanserde baskılayıcı rolü. Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2010; 8 (1): 35-42.

37. Rich JN, Borton AJ, Wang XF, Transforming büyüme factor-β signaling in cancer. Microsc. Res. Tech, 2001; 52: 363-373.

38. Massague J, TGF-Beta signal transduction. Annu Rev Biochem, 1998; 67: 753-91.

39. Tanagho EA, Smith DR, Guthrie TH. Pahophysiology of functional ureteral obstruction. J Urol, 1970; 104 (1) 73-88.

40. Gregoir W, Debled G. The etiology of congenital reflux and primary megaureter. Urol Int, 1969; 24(2): 119-34.

41. McLaughlin AP 3rd, Pfister RC, Leadbetter WF ve ark. The pathophysiology of primary megaloureter. J Urol, 1973; 109(5): 805-11

42. Dixon JS, Jen PY, Yeung CK ve ark. The vesicoureteric junction in three cases of primary obstructive megaureter associated with ektopic insertion. Br J Urol, 1998; 81(4): 580-4.

43. Keating MA. The nonrefluxing megaureter: pathophysiology and pathogenesis. In Ehrlich RM ed., Congenital obstructive megaureter: Etiology, diagnosis and treatment. Dialogues in Pediatric Urology. Vol. 16, no 2. New York: William Miller Associates, 1993: 2-4

44. Hanna MK, Jeffs RD, Sturgess JM. Ureteral structure and ultrastructure. Part III. The congenital dilated ureter (Megaureter). J Urol, 1977; 117: 24-31.

45. Beurton D. Le megauretere obstructif primitif de l'enfart et de l'adulte. J d'Urol, 1983; 89: 298-392.

46. Nicotina PA, Romeot C, Arena F. ve ark. Segmental up-regulation of trasnforming büyüme factor-β in the pathogenesis of primary megaureter. An immunocytochemical study. Br J Urol, 1997; 80(6): 946-9

47. Blachowski S, Motyl T, Orzechowski A ve ark. Comparison of metabolic effects of EGF, TGF-alpha, and TGF-beta 1 in primary culture of fetal bovine myoblasts and rat L6 myoblasts. Int J Biochem, 1993; 25(11):1571-7.

48. Gosling JA, Dixon JS. Functional obstruction of the ureter and renal pelvis. A histological and electron microscopic study. Br J Urol, 1978; 50(3):145-52.

49. Tokunaka S, Gotoh T, Koyanagi Tve ark. Muscle dysplasia in megaureters. J Urol, 1984;131(2):383-90.

50. Alcaraz A, Vinaixa F, Tejedo-Mateu A ve ark. Obstruction and recanalization of the ureter during embryonic development. J Urol, 1991;145(2):410-6.

51. Florini JR, Magri KA. Effects of büyüme factors on myogenic differentiation. Am J Physiol, 1989;256(4 Pt 1):C701-11.

52. Ewton DZ, Spizz G, Olson EN ve ark. Decrease in transforming büyüme factor-beta binding and action during differentiation in muscle cells. J Biol Chem, 1988; 263(8):4029-32.

53. Massague J, Cheifetz S, Endo T ve ark. Type β transforming büyüme factor is an inhibitor of myogenic differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(21):8206-10.