

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

FOSFODİESTERAZ 5 İNHİBİSYONUNUN
SIÇAN MODELİNDE BÖBREK TAŞI OLUŞUMUNA ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Ergün GÜRER

Danışman: Prof. Dr. Erdal APAYDIN

İzmir, 2013

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin her aşamasında çok değerli yardımlarını ve desteklerini gördüğüm, mesleki bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Bülent Semerci ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Erdal Apaydın olmak üzere Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. İbrahim Cüreklibatır, Sayın Prof. Dr. Oktay Nazlı, Sayın Prof. Dr. Ceyhun Özyurt, Sayın Prof. Dr. Çağ Çal, Sayın Prof. Dr. Barış Altay, Sayın Doç. Dr. Burak Turna ve Sayın Doç. Dr. Adnan Şimşir'e şükranlarımı ve saygılarımı sunarım.

Mesleksel eğitimim yanında bu çalışmanın başından sonuna bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Erdal Apaydın'a ve Sayın Doç. Dr. Adnan Şimşir'e tezime olan katkılarından dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Histolojik incelemeleri gerçekleştiren ve çalışmanın her aşamasında desteklerini sunan Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. M. İbrahim Tuğlu, Sayın Uzm. Biyolog Işıl Aydemir ve Sayın Biyolog M. Mustafa Özkut'a teşekkürlerimi sunarım. Deneylerin gerçekleştirildiği CBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deneysel Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

İhtisasım boyunca ve ayrıca çalışmalarımın her devresinde bana büyük destek veren, herbirini ailemden biri gibi gördüğüm asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bana bir aile ortamında çalışmanın keyfini ve güvenini yaşattıkları için tüm Ege Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı hemşire ve klinik çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Ve benden hiçbir zaman manevi desteğini eksik etmeyen, bu çalışmanın her saniyesini benimle yaşayan, hayatımın her aşamasında yanımda olan ve tüm stresimi paylaşan eşim Dr. Deniz Ersayın Gürer'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Ergün Gürer

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Genel Bilgiler – Böbrek.....	3
2.1.1. Böbrek Anatomisi	3
2.1.2. Böbrek Fizyolojisi.....	4
2.1.3. Böbrek Embriyolojisi	6
2.1.4. Böbrek Histolojisi.....	7
2.2. Genel Bilgiler – Üriner Sistem Taş Hastalığı.....	9
2.2.1. Epidemiyoloji.....	10
2.2.2. Etiyoloji	12
2.2.3. Taş Oluşum Mekanizmaları.....	12
2.2.3.1. Süpersatürasyon – Kristalizasyon Teorisi	13
2.2.3.2. İnhibitör Eksikliği Teorisi	14
2.2.3.3. Matriks – Nükleasyon Teorisi	15
2.2.3.4. Epitaksi.....	15
2.2.3.5. Kombine Teoriler	15
2.2.3.5.1. İntranefronik ve Fiks Nükleasyon	15
2.2.3.5.2. Ekstranefronik ve Serbest Partikül Nükleasyonu.....	15
2.2.3.5.3. Kombine Teori.....	16
2.3. Genel Bilgiler – Deney Modeli.....	16
2.3.1. Sıçan Üriner Sistem Taş Modeli	16
2.3.2. Oksalat Metabolizması	18
2.3.2.1. Primer Hiperoksalüri.....	18
2.3.2.2. Enterik Hiperoksalüri.....	19
2.3.2.3. Diyete Bağlı Hiperoksalüri	19
2.3.2.4. İdiyopatik Hiperoksalüri	19
2.3.3. Renal Hasar Oluşumu.....	19

2.3.3.1.	Hiperoksalüriye Bağlı Hasar	19
2.3.3.2.	Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller.....	20
2.3.3.2.1.	Nitrik Oksit	21
2.3.3.2.2.	Süperoksit Dismutaz	22
2.3.3.2.3.	Malondialdehit.....	22
2.3.3.3.	Apoptozis.....	22
2.3.4.	Sildenafil Sitrat	24
2.3.5.	Potasyum Sitrat	24
3.	YÖNTEM.....	26
3.1.	Hayvanlar ve Anestezi	26
3.2.	Deneysel Model ve Cerrahi İşlem	26
3.3.	Histolojik Değerlendirme	26
3.4.	Avidin-Biyotin Peroksidaz Yöntemi ile İmmünohistokimyasal Değerlendirme	29
3.4.1.	NOS İmmünohistokimyası	31
3.4.2.	TUNEL İmmünohistokimyası.....	31
3.5.	Biyokimyasal Değerlendirme	32
3.6.	İstatistiksel Değerlendirme.....	33
4.	BULGULAR	34
4.1.	Biyokimyasal Bulgular	34
4.2.	Oksidatif Stres Bulguları	37
4.3.	Histolojik Bulgular	39
4.4.	İmmünohistokimyasal Bulgular.....	49
5.	TARTIŞMA	57
6.	SONUÇ	61
7.	KAYNAKLAR.....	62

KISALTMALAR

AC	Amonyum Klorür
CaOx	Kalsiyum-Oksalat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EG	Etilen Glikol
cGMP	Siklik Guanozin Mono Fosfat
İHK	İmmünohistokimyasal
KCit	Potasyum Sitrat
M	Muskulus
MDA	Malondialdehit
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PDE	Fosfodiesteraz
SOR	Serbest Oksijen Radikali
SWL	Şok Dalga Litotripsi
TUNEL	Terminal Deoxynükleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Grupların Renal Kalsiyum ve İdrar Parametreleri Açısından Karşılaştırılması	34
Şekil 2. İdrar Direkt Bakışında Kristalürinin Değerlendirilmesi	35
Şekil 3. Grupların Oksidatif Stres Parametreleri Açısından Karşılaştırılması.....	38
Şekil 4. Grupların Böbrek Makroskobik Görüntüleri	40
Şekil 5. Renal Korteks Küçük Büyütme Mikroskopi Görüntüleri.....	42
Şekil 6. Renal Medulla Küçük Büyütme Mikroskopi Görüntüleri	43
Şekil 7. Renal Korteks Büyük Büyütme Mikroskopi Görüntüleri.....	44
Şekil 8. Renal Medulla Büyük Büyütme Mikroskopi Görüntüleri	45
Şekil 9. Renal Korteks x400 Büyütme Mikroskopi Görüntüleri	46
Şekil 10. Renal Medulla x400 Büyütme Mikroskopi Görüntüleri.....	47
Şekil 11. Grupların Morfometrileri Açısından Karşılaştırılması	49
Şekil 12. eNOS İHK Boyama Mikroskobik Görüntüleri.....	50
Şekil 13. iNOS İHK Boyama Mikroskobik Görüntüleri.....	51
Şekil 14. TUNEL İHK Boyama Küçük Büyütme Mikroskobik Görüntüleri	53
Şekil 15. TUNEL İHK Boyama Büyük Büyütme Korteks Mikroskobik Görüntüleri.....	54
Şekil 16. TUNEL İHK Boyama Büyük Büyütme Medulla Mikroskobik Görüntüleri.....	55
Şekil 17. Grupların İHK Boyama Sonuçları Açısından Karşılaştırılması	56

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Parafin Doku Takip Protokolü	27
Tablo 2. Bouin Takip Protokolü	28
Tablo 3. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	28
Tablo 4. Avidin-Biyotin Peroksidaz Yöntemi İle İndirekt İHK Boyama Protokolü.....	30
Tablo 5. Renal Kalsiyum Değerleri ve İstatistik Sonuçları	36
Tablo 6. İdrar Kalsiyum Değerleri ve İstatistik Sonuçları.....	36
Tablo 7. İdrar Oksalat Değerleri ve İstatistik Sonuçları	36
Tablo 8. Kristalüri Değerleri ve İstatistik Sonuçları.....	37
Tablo 9. NO Değerleri ve İstatistik Sonuçları	38
Tablo 10. SOD Değerleri ve İstatistik Sonuçları.....	38
Tablo 11. MDA Değerleri ve İstatistik Sonuçları.....	39
Tablo 12. Korteks Makroskobisi Verileri ve İstatistik Sonuçları	41
Tablo 13. Medulla Makroskobisi Verileri ve İstatistik Sonuçları	41
Tablo 14. Korteks Mikroskobisi Verileri ve İstatistik Sonuçları.....	48
Tablo 15. Medulla Mikroskobisi Verileri ve İstatistik Sonuçları	48
Tablo 16. iNOS İHK Verileri ve İstatistik Sonuçları	52
Tablo 17. eNOS İHK Verileri ve İstatistik Sonuçları.....	52
Tablo 18. TUNEL İHK Verileri ve İstatistik Sonuçları	56

ÖZET

Fosfodiesteraz 5 İnhibisyonunun Sıçan Modelinde Böbrek Taşı Oluşumuna Etkisi

Taş hastalığı, klinik pratikte sıklıkla karşımıza çıkmakta ve yüksek rekürrens oranları göstermektedir. Kalsiyum-oksalat (CaOx) taşları en sık görünen tip olmakla birlikte, hiperoksalüri idiyopatik CaOx taşı gelişiminde önemli bir risk faktörüdür. Klinik ve deneysel çalışmalarda, oksalat ve CaOx kristallerinin hedefinin, renal tübüler hücreler olduğu ve bu hücrelerde oksidatif hasarlanma ve apoptozis geliştiği gösterilmiştir. Biz de bu çalışmamızda, sıçan modelinde hiperoksalüri ile oluşan oksidatif stres, renal apoptotik değişiklikler ve taş oluşumu üzerinde, sildenafil sitrat ve potasyum sitrat (KCit) kullanımının koruyucu etkilerini araştırdık.

Toplam 50 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan çalışmaya alındı. Taş modeli litojen olarak içme suyunda 14 gün etilen glikol %0,75 ve amonyum klorür %1 verilerek oluşturuldu. Negatif kontrol, pozitif kontrol (litojen), SS (litojen + sildenafil), PS (litojen + KCit) ve SP (litojen + sildenafil + KCit) grubu şeklinde her grupta 10 hayvan olacak şekilde sıçanlar ayrıldı. İdrar biyokimyası, böbrek histoloji ve immünohistokimyası (NOS ve TUNEL), oksidatif stres (NO, SOD, MDA) ve renal kalsiyum birikimi değerlendirildi.

Bulgularda pozitif kontrol grubunda litojene bağlı anlamlı morfolojik ve immünohistokimyasal değişiklikler, hiperkalsiüri, hiperoksalüri, kristalüri, artmış renal kalsiyum birikimi ve yükselmiş oksidatif stres parametreleri saptandı. Sildenafil kullanımı ile oksidatif streste, renal tübüler hasarda, renal kalsiyum birikiminde ve kalsiüride anlamlı azalma saptandı. KCit ile tedavi gören grupta ise hiperkalsiüri ve hiperoksalüride artış; oksidatif streste, renal tübüler hasarda ve renal kalsiyum birikiminde azalma izlendi. İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde SS ve PS grubu arasında anlamlı fark gözlenmedi. Ancak SS grubunda PS grubuna göre daha az renal kalsiyum birikimi saptandı. SP grubunda, monoterapi grupları ile karşılaştırıldığında daha düşük apoptotik ve histolojik hasarlanmaya eşlik eden düşük MDA düzeyi izlendi.

Sildenafil sitrat, taş oluşumunu azaltmaya yönelik deneysel aşamada bir aday olmakla birlikte, oluşturduğu biyokimyasal ve immünohistokimyasal değişikliklerin anlaşılması için yeni deneysel ve moleküler çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

ABSTRACT

The Effect of Phosphodiesterase 5 Inhibitor on Kidney Stone Formation in Rat Model

Urolithiasis is seen frequently with high recurrence rates in clinical practice. Calcium-oxalate (CaOx) stones are the most common type and hyperoxaluria is an important risk factor in idiopathic CaOx stones. Clinical and experimental studies showed that oxalate and CaOx crystals are hazardous to renal tubular cells by developing oxidative injury and apoptosis. In this study we evaluated the protective effects of sildenafil citrate and potassium citrate (KCit) on oxidative stress, renal apoptotic changes and stone formation in hyperoxaluria rat model.

The study included 50 male Wistar Albino rats. Stone model was induced by ethylene glycol 0,75% and ammonium chloride 1% as lithogens in drinking water. Negative control, positive control (lithogen), SS (lithogen + sildenafil), PS (lithogen + KCit) and SP (lithogen + sildenafil + KCit) groups with 10 animals each were formed. Urine biochemistry, kidney histology and immunohistochemistry (NOS and TUNEL), oxidative stress (NO, SOD, MDA) and renal calcium content were evaluated.

Positive control group showed significant morphologic and immunohistochemical changes, hypercalciuria, hyperoxaluria, crystaluria, high renal calcium content and elevated oxidative stress parameters. Sildenafil administration significantly reduced oxidative stress, renal tubular injury, renal calcium deposition and crystaluria. KCit medication group had increased hypercalciuria and hyperoxaluria; decreased oxidative stress, renal tubular injury and renal calcium content. Immunohistochemical procedure showed no significant difference between groups SS and PS. However, SS group had lower renal calcium content compared to PS group. We observed less apoptotic and histologic injury accompanied with low MDA levels in SP group in comparison with monotherapy groups.

Although sildenafil citrate is a candidate to minimise stone formation in experimental phase, it needs support of new experimental and molecular studies to reveal related biochemical and immunohistochemical changes.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Taş hastalığı, klinik pratiğimizde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Hayat boyu semptomatik taş hastalığı prevalansı erkeklerde %13, kadınlarda ise %7 olarak saptanmış olsa da (1), esas olgu yükünü rekürren olgular oluşturmaktadır. Rekürrens oranları konusunda yapılan çalışmalar, ilk taşların tedavi sonrası 1 yıl içinde %15 ve 5 yıl içinde %50 gibi yüksek oranda nüks ettiğini göstermektedir (2).

Taş hastalığının geçmişi M.Ö. 4800'lü yıllara uzanmaktadır. Ancak günümüzde halen taş hastalığının fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Koruyucu tedavi konusundaki çalışmalar, tedavi konusundaki araştırmaların gerisinde kalmaktadır. Gelişen endürolojik cerrahi ve şok dalga litotripsi (SWL) teknolojisi ile, taş tedavisinde yüksek başarı oranları elde edilmektedir, ama bu tedaviler yüksek başarı oranlarına rağmen rekürrens oranları üzerine etki göstermemektedir (3).

Rekürrensin önlenmesi amacı ile kullanılan potasyum sitrat (KCit), 25 yılı aşkın süredir üroloji pratiğinde olup medikal koruyucu tedavide ilk akla gelen ajandır. İdrar pH'sını ve idrar sitratını arttırarak idrardaki kalsiyum iyon aktivitesini kısıtlamaktadır. Ancak, son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda, en sık rastlanılan taş tipi olan kalsiyum-oksalat (CaOx) taşlarının gelişiminde KCit'in etki mekanizmasından farklı bir oluşum patofizyolojisi ortaya konmuştur. Hiperoksalüri, idiyopatik CaOx taşlarının gelişiminde en önemli risk faktörü olarak yer almaktadır. CaOx taşı oluşumunda, hiperoksalürinin renal hücrelerde oluşturduğu harabiyet önemi rol oynamaktadır. Oksalat iyonları ve CaOx kristalleri, renal epitelyal hücrelerde, özellikle renal tübüler hücrelerde hasar oluşturmaktadır. Deneysel hayvan modellerinde kristalüri oluşmadan da hasarın izlenmesi, oksalat ile ilişkili oluşan bu hasarın sadece CaOx kristallerine bağlı olmadığını ve oksalat iyonlarının da büyük rol oynadığını göstermektedir (4). Oksalat iyonlarına ve oluşan CaOx kristallerine bağlı olarak gelişen renal oksidatif stres ve tübüler apoptozis, özellikle idiyopatik CaOx taşı oluşumunda gözler önüne serilmiştir. Operatif papiller biyopsiler ile elde edilen Randall plaklarının histolojik incelemeleri ve deneysel sıçan modelinde hiperoksalüri ile saptanan apoptotik değişiklikler ve oksidatif stres parametrelerinde artış, bu durumu vurgular niteliktedir (5,6)

Sildenafil sitratın sahip olduğu renoprotektif etki konusunda gerçekleştirilen çalışmalarda, özellikle son dekad içinde bir artış söz konusudur. Renal iskemi/reperfüzyon hasarı, deoksikortikosteron asetat ile oluşturulan mineralokortikoid hipertansiyonu ve renal disfonksiyon modeli ve streptozosin ile oluşturulan diyabetik nefropati modeli gibi deneysel

modellerde sildenafil sitrat'ın özellikle apoptotik hücre hasarını ve oksidatif stres parametrelerini azalttığı gösterilmiştir (7-9).

Biz de bu çalışmamızda, sıçan modelinde hiperoksalüri ile oluşan oksidatif stres ve renal apoptotik değişiklikler üzerinde, fosfodiesteraz (PDE) izoenzim seçici inhibitörü olan sildenafil sitrat kullanımının etkilerini araştırdık. Aynı zamanda, renal kalsiyum ve kristalüri gibi biyokimyasal parametrelerin de ölçümü ile, PDE 5 enzim inhibisyonunun sıçan modelinde böbrek taşı oluşumuna etkisini ortaya koymayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genel Bilgiler – Böbrek

2.1.1. Böbrek Anatomisi

Böbrekler karın arka duvarının en üst kısmında spinal kolonun her iki tarafında yer alan retroperitoneal alanda yerleşmiş, solid yapıda ve oval şekilli organlardır. Paravertebral alanda, üstte torakal 12 ve altta lomber 3. vertebra arasında yer alırlar. Columna vertebralis'e paralel olarak değil, üst polleri orta hatta daha yakın, alt polleri orta hattın daha uzaktadır. Sağ böbrek, karın boşluğunun sağ üst kısmında karaciğerin bulunması nedeniyle, sol böbrekten 1-3 cm kadar daha aşağıda bulunur. Krista iliaca ile alt uçları arasındaki mesafe 2-5 cm kadardır. Solunum ile 1-4 cm kadar hareket ederler ve bu hareket sağda daha fazla, aynı zamanda zayıf kişilerde daha belirgindir. Böbreklerin uzun çapı 9-13 cm, ön-arka çapı ortalama 3-4 cm, dış-iç enine çapı 5-6 cm kadardır (10).

Genellikle sol böbrek sağdan 0.5-1.5 cm kadar daha büyüktür. Ağırlığı erişkin erkeklerde ~150 gr, kadınlarda ~135 gr kadardır. İki böbreğin toplam ağırlığı vücut ağırlığının yaklaşık 1/240'ı kadardır. Yeni doğan bebeklerde bu oran üç kat daha büyüktür. Bebek böbreklerinde fetal lobulasyonlar izlenebilir, genellikle 1 yaşından sonra ortadan kalkmaktadır. Böbrekler radyografilerde ultrasonografiye göre daha büyük çıkmaktadır. Bunun nedeni magnifikasyon oluşumu ve damar yoluyla verilen kontrast maddenin böbreklerden atılımı esnasında böbreklerin 1-2 cm kadar genişlemesi olarak ifade edilebilir (11).

Böbreklerin facies anterior ve facies posterior olmak üzere iki yüzü, margo medialis ve margo lateralis olmak üzere iki kenarı, ekstremita superior ve ekstremita inferior olmak üzere iki de kutbu vardır. Margo lateralis konvektir. Sinüs renalis ile pelvis renalisin bulunduğu margo medialis ise konkavdır. Margo medialisin bu şekli ile böbrekler yapı olarak bir fasülyeye benzemektedir (10).

Böbrek, içten dışa doğru kapsula fibrosa, kapsula adiposa ve fascia renalis tarafından sarılır. Bu kılıflardan kapsula fibroza böbreği dıştan saran, ince fakat sağlam bir fibröz kılıftır. Kapsula fibrosanın dışında yer alan yağ tabakası kapsula adiposa olarak adlandırılır. Fascia renalis ise karın duvarındaki fascia subserosa'nın kapsula adiposa'yı dıştan saran bölümüdür.

Böbrekler arkada diafragma, musculus (m) psoas major, m. quadratum lumborum, m. transversus abdominis ve lomber pleksus'un iki dalı ile komşuluk yapar. Sol böbrek 11. ve 12. kostalarla komşuluk yaparken, sağ böbrek yalnızca 12. kosta ile komşudur. Sol böbrek pankreas kuyruğu, dalak, kolon ve glandula suprarenalis ile komşudur. Sağ böbrek karaciğer, duodenum, kolon ve glandula suprarenalis ile komşudur.

Böbrekler karın arka duvarına korpus pararenalis adı verilen yağ dokusu aracılığı ile oturmuşlardır. Gerota fasiyası böbreği superiorından, medialden ve lateralden sararak böbrek kaynaklı patolojik durumları sınırlayan çok önemli bir anatomik bariyerdir. Ayrıca böbrekler her yönden perinefrik yağ dokusu ile sarılır. Böbrek kısmen renal fasiya tarafından tutulur. Böbreği yerinde tutan asıl faktör ise komşu visseranın apozisyonudur.

Böbrek, bol fibröz lifler, daha az sarı elastik lifler ve çok az da düz kas liflerinden oluşan kapsula fibrosa ile sarılır. Hilus, böbreğe giren ve çıkan damarlardan ve pelvisten meydana gelir ve böbreğin medialinde yer alır. Renal hilusta önde vena renalis, ortada arteria renalis, arkada da pelvis renalis yer alır.

Böbreğin iç kısmı medulla olarak adlandırılır. Koni, piramit şeklinde 8 – 18 adet uzantıdan oluşmaktadır. Bu yapıların tepeleri hilusa, tabanları ise kortekse bakmaktadır. Koniler birbirlerinden korteksin uzantıları olan kolumna renalisler ile ayrılır. Bu kısımda sadece tübülüsler yer alır. Her bir piramit kendini saran korteks bölümü ile birlikte bir böbrek lobunu oluşturur.

Korteks ise piramidler arasına kolumna renalis'ler olarak girer. İki piramid basis'i arasında kalan, iki kolumna'yı birleştiren korteks bölümüne, kapsülü ile birlikte lobus kortikalis denir.

2.1.2. Böbrek Fizyolojisi

Böbreklerin görevi, aktif emilim, pasif emilim ve salgılama işlevlerini kapsayan karmaşık bir dizi işlem aracılığı ile vücuttaki metabolizma artıklarını dışarı atmak ve vücut sıvılarındaki maddelerin konsantrasyonunu kontrol etmektir. Böbreğin fonksiyonel ünitesine “nefron” adı verilir. Her bir böbrekte yaklaşık 1.200.000 adet nefron yer alır. Bir nefron temel olarak sıvının filtre edildiği glomerül ile filtre edilen sıvının böbrek pelvisine akarken idrar niteliklerini kazandığı uzun bir tübüden oluşmuştur. Her bir nefron kendi başına idrar yapma yeteneğine sahiptir. Glomerülleri kortekse yakın olan nefronlar kortikal nefron, uzak olan nefronlar ise jukstamedullar nefron olarak adlandırılır (12).

Kanı glomerül içine getiren artere afferent arteriyol, glomerülden taşıyan artere ise efferent arteriyol adı verilir. Glomerül afferent ve efferent arteriyol arasında 50 kadar paralel dala ayrılıp anastomozlar yapan kapillerlerden oluşur. Epitel hücreleriyle örtülü olan bu kapiller yumak Bowman kapsülü adı verilen bir yapı tarafından sarılır.

Glomerül afferent ve efferent arterioller arasındaki kan basıncı farkı ile sıvının kapsül içine süzülmesi sağlanır. Süzülen ultrafiltrat, kortekste glomerülün yanında yer alan proksimal tübüllere akar. Proksimal kıvrımlı tübüller filtrattaki glukoz ve aminoasitlerin tümünü, suyun ve sodyum klorürün % 85'ini ve ayrıca fosfat ve kalsiyumu geri alır. Bütün bunlara ek olarak

proksimal kıvrımlı tübüller kreatinin gibi maddeleri ve paraaminohippurik asit, penisilin ve iodopyracet (kontrast madde) gibi vücuda yabancı olan maddelerin idrara salgılandığı bölgedir. Bu maddelerin sekresyon hızının belirlenmesi böbrek işlevlerinin klinik açıdan değerlendirilmesinde yardımcıdır. Sıvı daha sonra Henle kulpuna geçer. Henle kulpunun inen kısmı ile çıkan alt ucunun çapı ince olduğundan “ince segment” olarak adlandırılır. Henle kulpu medullaya kadar uzanım göstermektedir. Çıkan kolu kortekse tekrar yükselirken kalınlaşır ve kolun “kalın segment”ini oluşturur. Henle kanalının görevi suyun tutulmasıdır. Burada toplayıcı kanallardan geçen idrarın konsantrasyonunu etkileyen medüller interstisyumdaki hipertonic gradyan olmaktadır. Sıvı henle kulpundan sonra kortekste yer alan distal tübüle geçer. Distal kıvrımlı tübüllerde iyon değişimi gerçekleşmektedir. Aldosteron konsantrasyonu yeterince yüksek olduğunda distal kıvrımlı tübüllerde sodyumun emildiği, potasyum iyonlarının ise dışarı verildiği bir iyon değişim bölgesi bulunur. Burası vücuttaki total su ve tuzları kontrol etmektedir. Distal tübül aynı zamanda tübüldeki idrara hidrojen ve amonyum iyonlarını salgılar ve etkinlik kandaki asit-baz dengesinin korunmasında çok önemlidir. Distal tübüller birleşerek toplayıcı tübülleri oluşturur, toplayıcı tübüller de korteksten medullaya dönerek orada toplayıcı kanallara dönüşürler. Toplayıcı kanalların epiteli arka hipofizden salgılanan antidiüretik hormona duyarlıdır. Su alımı azaldığında antidiüretik hormon salgılanır ve toplayıcı kanalların epiteli suya geçirgen hale gelir. Toplayıcı kanallar medullanın derinliklerine doğru henle kulpuna paralel ilerlerken birbirileriyle birleşerek genişlerler. En distal kısımda geniş toplayıcı kanal böbrek papillasının ucundan renal pelvikalisiyel sisteme açılır. Bu papillalar medullanın böbrek kaliksine doğru yaptıkları çıkıntılar olarak ifade edilebilir.

Erişkin bir kişide her iki böbreğe gelen kan miktarı dakikada 1,2 – 1,3 litre kadardır. Bu yüksek kan akımı, vücutta dolaşan bütün kanın her 4-5 dakikada bir böbreklerden geçtiği anlamına da gelmektedir. İki böbrek tarafından dakikada 125 ml filtrat üretir. Filtratın büyük bir kısmı geri emilerek yalnız 1 ml’si idrar olarak kalikslere salınır. 24 saatte ortalama 1500 ml idrar oluşmaktadır.

Glomerüler filtrat, kanın hidrostatik basıncına yanıt olarak oluşmaktadır. Glomerül filtratın kimyasal bileşimi kan plazmasına benzer ancak makromoleküller glomerül duvarını geçemediği için hemen hiç protein içermez. Glomerül kapillerlerinin endotel hücre tabakasında 70-90 nm çapında fenestrasyonlar bulunur. Bir diyafram yapısının bulunmaması sayesinde endotel geçirgenliği artar.

Böbrek tübül sistemi peritübül kapiller ağ tarafından sarılmaktadır. Peritübül kapiller ağ, glomerullardan çıkan efferent arteriyollerin devamıdır. Peritübül kapiller ağın büyük

kısmı kortekste yer alan proksimal tubulus, distal tubulus ve toplayıcı kanallar boyunca uzanmaktadır. Vaza rekta, ağın derinlerdeki düz parçasıdır ve papillaya kadar devam ettikten sonra henle kıvrımı gibi kortekse dönüp kortikal venlere boşalır (13).

2.1.3. Böbrek Embriyolojisi

İntermediyer mezoderm embriyonun dorsal vücut duvarı boyunca yerleşir ve ürogenital sistemi oluşturmaktadır (14).

Embriyolojik gelişimde üriner sistem; genital sistemden önce gelişmektedir. Fetal dönemde 3 tip böbrek yapısı göze çarpmaktadır.

Pronefrozlar geçici, fonksiyonel olmayan yapılardır ve insan embriyosunda ilk olarak 4.haftanın başında ortaya çıkarlar. Az sayıda hücre kümesi ve kıvrılmış tübüler yapılardan oluşur ve embriyonun boyun kısmında yer alırlar. Pronefrik duktus, kaudal olarak uzanır ve kloakaya açılır. Rudimenter olan pronefrozlara ait yapılar, 5. haftanın başlangıcında dejenerasyona uğrarlar, ancak pronefrik duktuslarda çoğunluğu, belirli bir süre kalır ve bir sonraki böbrek siteminde bundan yararlanılır.

Mezonefrozlar; 4. haftanın sonuna doğru rudimenter yapılardan pronefrozların kaudalinde ortaya çıkarlar. Mezonefrozlar da geçicidir ancak gerçek böbrek gelişimi (metanefroz) oluşana kadar 1. trimester boyunca fonksiyon gösterirler. Mezonefrik kanallar embriyonun dorsolateral bölümünde nefrojenik kordlara paralel bir çift solid doku yoğunlaşması olarak görülür. Dördüncü aya kadar mezonefrozlar tamamen ortadan kalkar ancak mezonefrozların bazı bölümleri üreme sisteminin parçası olarak erişkin ürogenital sisteminde bulunur. Epididim ve vaz deferens mezonefroz kanallarından gelişir.

Metanefrozlar sakral bölgede yer alır ve 5. haftanın başında gelişmeye başlarlar. Yaklaşık 4 hafta sonra fonksiyonel hale gelirler ve intrauterin dönem boyunca idrar oluştururlar. Kalıcı böbrekler metanefrik divertikül ve intermediyer mezodermin metanefrik kitlesi olan metanefrik blastem olmak üzere iki farklı kökene sahiptir. Metanefrik divertikül veya ureterik tomurcuk, mezonefrik kanalın kloakaya giriş yerine yakın bir lokalizasyonda dışa doğru oluşan bir divertiküldür ve ureter, renal pelvis, kaliksler ve toplayıcı duktusların primordiyumudur. Metanefrik divertikülün sap kısmı uretere farklaşır ve genişleyen kranial uç kısmı renal pelvisi oluşturur. Metanefrik blastem ise nefrojenik kordonun kaudal kısmından köken almaktadır. Üreter tomurcuğunun ampulla ucu, nefron oluşumunu indüklemek üzere metanefrik mezoderm ile ilişkiye girerek metanefrik mezoderm içerisindeki mezenkimal hücre kümelerini uyarır ve küçük metanefrik veziküllerin oluşumuna neden olurlar. Bu veziküller uzarlar ve metanefrik tübülleri oluştururlar. Böbrek tübülleri bu şekilde gelişirken

uçlarından glomerüller gelişir. Nefron (glomerül, proksimal tübül, Henle kulbu ve distal tübül) metanefrik mezenkimden oluşurken, toplayıcı sistem ise üreter tomurcuğundan gelişmiş olur. Gebeliğin 10-18. haftaları arasında glomerüllerin sayıları yavaş yavaş artar ve 32. haftada sayısı en yüksek seviyede olur. Glomerüller filtrasyon fetal yaşamın 9. haftasında başlar ve doğumdan sonra filtrasyon oranında artış görülmektedir.

Karın ve pelvis büyümesi ile beraber böbrekler yavaş yavaş karın içerisine yerleşir ve yukarı doğru hareket ederler. Altıncı haftada başlayan yer değişimi 9. haftada sonlanır ve böbrekler yetişkindeki pozisyonlarına ulaşırlar. Böbrekler, sonunda karın arka duvarında retroperitoneal hale geçerler. Böbreklerin yükselmesi ile birlikte hilus medial hatta doğru 90 derecelik bir dönüş yapar. Yükselme başında hilus ventrale bakmakta iken 9. hafta ile birlikte, hilus anteromedial hatta yönelmiştir.

2.1.4. Böbrek Histolojisi

Böbrekler, üreterler, mesane ve üretra üriner sistemi oluşturur. Sistem, metabolik artıkları idrar oluşturup vücuttan uzaklaştırarak hemostazın devamına yardımcı olur. Böbreklerin oluşturduğu idrar, üreterler ile taşınarak mesanede depolanır ve üretra ile vücut dışına atılır. Böbreklerde renin ve eritropoetin hormonları üretilir. Bu hormonlardan renin kan basıncının düzenlenmesinde rol oynarken, eritropoetin ile kırmızı kan hücre serisinin üretimi uyarılır (12).

Böbreğin içbükey margo medialisinde hilus yer alır ve burası sinirlerin, üreterin ve kan ve lenf damarlarının böbreğe girip çıktığı yerdir. Renal hilusta renal arter ve renal ven anterior kısımda yer alır. Üreterin genişlemiş üst kısmı olan renal pelvis hilusta en posteriorda yer alır ve böbreğin içine doğru iki yada üç major kalikse bölünmüştür. Her major kaliksten ayrıca minör kaliksler dallanır.

Böbrek parankimi dışta yer alan korteks ve içte bulunan medulla olmak üzere iki bölümde incelenebilir. İnsanda renal medulla 10-18 adet konik yada piramidal şekilli yapılardan oluşur. Bunlara medüller piramidler adı verilir. Her bir medüller piramidin tabanından kortekse uzanan birbirine paralel tübül demetleri, medüller ışınlar çıkar. Her medüller ışın böbreğin fonksiyon gören birimleri olan birkaç nefron grubunun düz kısımları ile birlikte bir yada daha çok sayıda toplayıcı kanaldan oluşur.

Mikroskopik olarak böbreğin en küçük anatomik ve fonksiyonel ünitesi nefrondur ve her iki böbrekte yaklaşık 2,4 milyon kadar bulunur. Bir nefron yaklaşık 50 µm uzunluğundadır. Her biri kendi başına idrar yapma yeteneğindedir. Nefronlar kortikal ve jukstamedüller olmak üzere 2 çeşittir:

Kortikal nefronlar: Henle kulplarıyla beraber kortekste olup tüm nefronların %85'ini oluşturur.

Jukstamedüller nefronlar: Uzun henle kulplarıyla beraber korteks-medulla kavşağında olup nefronların %15'ini oluşturur.

Her nefron genişlemiş bir bölüm olan renal cisimcik, proksimal kıvrımlı tübül, henle kanalının ince ve kalın uzantıları ve distal kıvrımlı tübülden oluşmaktadır. Her renal cisimciğin çapı yaklaşık olarak 200 µm'dir ve kapiller bir yumak olan glomerülden oluşmuştur. Bu yumak Bowman kapsülü olarak adlandırılan iki tabakalı epitelyal bir kapsülle sarılmış durumdadır. Bowman kapsülünün iki tabakası arasında, kapiller duvarından ve viseral tabakadan süzülen filtratın toplandığı idrar boşluğu bulunmaktadır.

Bowman kapsülünün pariyetal tabakası ince bir retiküler lif tabakası ve bazal lamina ile desteklenen tek katlı yassı epitelden oluşur. İdrar kutbunda proksimal tübül için karakteristik olan tek katlı prizmatik epitel yer alır. Glomerül kapillerlerinin endotel hücreleri ince bir sitoplazmaya sahiptir ve hücre organellerin çoğu sitoplazmanın çekirdek çevresinde kalınlaştığı kısımda yoğunlaşmıştır.

Renal cisimciğin idrar kutbunda, Bowman kapsülünün pariyetal yaprağının tek katlı yassı epiteli, proksimal kıvrımlı tübüllerde yerini prizmatik epitelyuma bırakır. Proksimal kıvrımlı tübüller, distal kıvrımlı tübüllerden daha uzundur ve tek katlı kübik yada prizmatik epitelle döşelidir. Hücrelerin apeksinde fırçamsı kenarı oluşturan yaklaşık 1 µm uzunluğunda çok sayıda mikrovillus yer alır. Mikrovillusların tabanları arasında çok sayıda kanalikül bulunur ve bu kanaliküller proksimal tübül hücrelerinin makromolekülleri emme kapasitesini oluşturur.

Henle kanalı proksimal kıvrımlı tübüllere yapıca çok benzeyen bir kalın inen kol, bir ince kol, bir çıkan kol ve yapıca distal kıvrımlı tübüllerle aynı olan bir çıkan koldan oluşan U şeklinde bir yapıdır. Bütün nefronların yaklaşık %15'i kortikomedüller sınırın yakınında bulunur, bu yüzden jukstamedüller nefronlar adını alırlar. Diğer nefronlara ise kortikal nefronlar denir. Jukstamedüller nefronların henle kanalı çok uzundur ve bunlar medullanın derinliklerine kadar inerler.

Henle kanalının çıkan kalın kolu kortekse girdiğinde histolojik yapısını korumakla birlikte bükülerek nefronun son kısmı olan distal kıvrımlı tübülleri oluşturur. Distal kıvrımlı tübüller tek katlı kübik epitelle döşelidir. Distal tübül epitel hücreleri, proksimal tübül epitel hücrelerinden daha kısadır ve fırçamsı kenarları bulunmaz. Distal tübüllerin lümenleri daha geniştir ve buradaki hücreler proksimal tübüllerde bulunan hücrelerden daha yassı ve küçük olduğu için aynı kesitte distal tübül duvarlarında daha çok sayıda nükleus ve hücre bulunur.

Distal tübüllerde, proksimal tübül epitelinde yer alan apikal kanalikül ve veziküller bulunmaz. Distal kıvrımlı tübül hücrelerinin bazal membranlarında yoğun invajinasyonlar ve bunlarla ilişkili mitokondriler yer almaktadır. Bu durum, distal kıvrımlı tübül epitel hücrelerinin iyon taşınmasında rol oynadıklarını göstermektedir.

Distal kıvrımlı tübüller birbirlerine bağlanarak daha büyük, düz toplayıcı kanalları oluşturan toplayıcı tübülleri oluşturur. Bu kanallara Bellini papiller kanalları da denir ve piramidlerin uçlarına doğru giderek genişler. Küçük toplayıcı tübüller, kübik epitel dölüdür ve ortalama 40 µm'dir. Bu tübüller medullanın derinliklerine doğru indikçe epitel hücrelerinin boyları uzar ve prizmatik olur. Işık mikroskobu ile bakıldığında toplayıcı tübül ve kanal hücreleri hücreler arasında lateral kenetlenmeler bulunmadığı için hücreler arası sınırları net olarak seçilebilir. Toplayıcı kanallar medullada gerçekleştirilen idrar yoğunlaştırma işleminde en önemli rolü oynamaktadır.

Renal korpuskülün hemen bitişğinde afferent arteriyolün tunika mediasında modifiye düz kas hücreleri yer alır ve bu hücrelere jukstaglomerüler hücreler olarak adlandırılır. Bu hücreler eliptik çekirdeklere sahiptir ve sitoplazmalarında PAS tekniğı ile boyanan granüller yer alır. Jukstaglomerüler hücrelerin renin salgısı kan basıncının düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

2.2. Genel Bilgiler – Üriner Sistem Taş Hastalığı

Taş hastalığı, üriner infeksiyonlar ve prostat patolojilerinden sonra üriner sistemi en sık etkileyen üçüncü patolojidir. Hastalık MÖ 4800'lü yıllardan beri bilinmektedir, örneğın Mısır mumyalarında böbrek ve mesane taşlarına rastlanılmıştır. Eski Roma, Yunan, Çin, Hint, Mısır ve Mezopotamya tarihinde taş hastalığıın tanı ve tedavisi açısından birçok fikir ortaya atılmıştır. İdrarın rengi, tadı ve miktarı değerlendirilerek taş hastalığıın varlığına dair fikirler belirtilmiştir. 1940'dan sonra taş oluşumu ile ilgili bir takım fizyolojik gözlem ve araştırmaların sonuçları sunulmaya başlanmıştır. Kalsiyum ve ürik asitin önemi, idiopatik hiperkalsiürinin hiperparatroidizmden ayrılması ve taşın böbrekte oluşum yerleri, taşların kristaloid ve kolloid yapıları gibi üriner sistem taşların kimyasal ve yapısal özellikleri oldukça yeterli şekilde ortaya konmuştur. Ancak teknolojidaki tüm gelişmelere rağmen taş hastalığı etiyojisi bugün bile hala tam aydınlatılamamıştır. Bunun nedeni olarak taş hastalığıın tek bir nedenle oluşmadığını, karmaşık ve birbiri ile ilişkili birçok faktörün taş oluşumunda rol aldığını söylemek mümkündür (3).

Taş hastalığıın tedavisinde medikal yaklaşımın gösterdiği gelişmeler nedeniyle klasik yöntemler, böbrek taşlarının tedavisinde giderek az oranda kullanılmalarına karşın

günümüzde de etkin ve geçerli yöntemlerdir. 1980'de uygulanılmaya başlanan SWL ile böbrek taşlarının tedavisinde cerrahinin rolü önemli ölçüde azalmıştır. Endoürolojideki ilerlemeler ile kullanıma giren perkütan teknikler ve laparoskopinin kullanımı da açık cerrahinin sınırlarını daraltmaya devam etmiştir. Üçüncü basamak tedavi merkezlerinde açık cerrahinin taş vakalarının %1'inden daha azına uygulandığı bildirilmektedir (15).

2.2.1. Epidemiyoloji

Taş hastalığı endüstriyel toplumlarda populasyonun %1-5'ini etkilemektedir. CaOx yada hidroksiapatit kombinasyonu en sık görülen tip olmaktadır (3). Hayat boyu semptomatik üriner sistem taş hastalığı prevalansı erkeklerde %13, kadınlarda ise %7 olarak saptanmıştır (1). Kadınlarda taş hastalığının az görülmesinde kadın idrarındaki sitrat miktarının yüksek olması rol oynamaktadır. Yetişkin siyah erkeklerde ise taş hastalığı beyaz erkeklere göre 1/3 ya da 1/4 oranında daha az görülmektedir. Ancak siyah hastalarda üreaz salgılayan organizmalarla oluşan taş hastalığı prevalansı daha yüksek bulunmuştur (16).

Üriner sistem taş hastalığı prevalansı ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte, erişkinlerdeki prevalans doğu ülkelerine göre batı ülkelerinde nispeten daha fazladır. Asya'da %1-5, Japonya'da %7, Avrupa'da %5-9, Kanada'da %12 ve ABD'de %13-15 oranlarında yayınlanmış üriner sistem taş hastalığı prevalansı olmasına rağmen Suudi Arabistan gibi bazı Asya ülkelerinde prevalans %20.1 olarak bildirilmektedir (17).

Ülkemizde Akdeniz, Karadeniz ve Güneydoğu illerinde prevalans yüksektir. Bir çalışmada taş hastalığı prevalansının ülkemizde genel olarak %14,8 olduğu bildirilmiştir (18). Üriner taş hastalığı 20-40 yaşları arasında pik yapmakta ve erkeklerde kadınlara oranla daha sık rastlanılmaktadır.

Rekürrens oranlarına baktığımızda, ilk taşların 1 yıl içinde %15 ve 5 yıl içinde %50 gibi yüksek değerlerde izlenmektedir (2). Ayrıca farklı bir yayında üriner sistem taşı olan hastaların ilk tedavisinden sonra herhangi bir koruyucu tedavi verilmediğinde üriner taşlarının yaklaşık %40'ının 3 yıl içerisinde tekrarlayacağı bildirilmiştir (19).

Epidemiyolojik çalışmalar sonucunda pediatrik yaş grubunda ürolitiazis insidansının son yıllarda arttığı ve taş kompozisyonu ve lokalizasyonunun da değiştiği ifade edilmektedir. Genelde mesanede saptanan amonyum urat taşları yerini CaOx ve kalsiyum fosfattan oluşan ve üst üriner sisteme lokalize taşlara bırakmaktadır. Pediatrik çağ ürolitiazisinde saptanan taşların kimyasal yapılarına bakıldığında %60-90'ını CaOx, %10-20'sinin kalsiyum fosfat, %5-10'unun ürik asit, %1-5'ini sistin, %1-18'inin strüvit ve %4'ünün miks taşlar ile oluşturulduğu göze çarpmaktadır. Altta yatan bir metabolik risk faktörü, üriner sistem taşı

olan çocuklarda %20-50 arasında değişen oranda saptanmaktadır (20). Hiperkalsüri ve hipositratri en sık tespit edilen metabolik risk faktörleridir.

Taş hastalığında hereditenin rolü üzerinde durulmuştur. Renal tubuler asidozis, sistinüri gibi belirgin familyal hastalıklar vardır. Ancak familyal sistinüride aynı miktarda sistin eliminasyonuna rağmen sadece bazı olgularda taş oluşması, genetik defektin poligenik olduğunu düşündürmektedir (21).

Taş hastalığında bazı coğrafi bölgelerde daha sık görüldüğü tespit edilmiş ve dünya taş haritası çıkarılmıştır. Dünya taş haritasına göre, İskandinav ülkeleri, Akdeniz ülkeleri, Kuzey Hindistan, Pakistan, Kuzey Avustralya, Avrupa'nın orta kısımları, Malezya ve Orta Amerika'da taş hastalığı yoğun olup Güney Amerika ve Afrika'da daha seyrek. Ülkemizde Akdeniz, Karadeniz ve Güneydoğu'da daha fazla görülür (3, 21).

İklim ile taş oluşumu arasında direkt ilişki kurulamasa da sıcaklığın yüksek olduğu yerlerde ve yaz mevsimlerinde daha fazla görülmektedir, fakat Güney Amerika ve Afrika gibi sıcak bölgelerde de taş hastalığının daha az görülmesi bu tezi tam doğrulamamaktadır. Güneş ışınlarına fazla maruziyet bağırsaktan kalsiyumun emilimini ve idrar kalsiyum atılımını arttırdığı bildirilmiştir. Ancak sıcak iklimde yaşamın risk faktörü olduğu kesindir. Ter ile atılan sıvı nedeniyle idrar konsantrasyonu artarken, pH azalmaktadır. Bu durum CaOx gibi kristallerin konsantrasyonunu artırırken, diğer taraftan azalan pH ürik asit ve sistin gibi moleküllerin çözünmesi zorlaşmaktadır (21).

Su tüketimi de taş oluşumunda önemlidir. Günlük idrar miktarını 800 ml'den 1200 ml'ye çıkması ile taş oluşumu % 86 oranında azalır (22). Diürez idrardaki iyon aktivitesini artırarak kristal oluşumunu hızlandırmaktadır, ancak serbest kristal partiküllerinin geçişi de hızlandığı için taş riski azalmaktadır. Mineral yönünden zengin sodalı sular konusu tartışmalıdır. Araştırmaların bir kısmı, kalsiyum fosfat gibi maddeleri içeren aşırı sert suların taş oluşumunu kolaylaştırdığını bildirmesine karşın, diğer bir kısım araştırmacı sodyum karbonat gibi maddeleri içeren yumuşak suların da bu olayı artırdığını bildirmişlerdir (23).

Beslenme ile taş hastalığı arasındaki ilişki net olmasa da dikkatli bir beslenme hikayesi taş hastalığının araştırılmasında önem arzeder. Pürin ve sodyumun diyetle aşırı alınması idrarla bu maddelerin aşırı atılmasına ve taş oluşumunun kolaylaşmasına yol açabilir (24). Diyetteki hayvansal proteinlerin azalması ile özellikle mesane taşı arasında bir ilişki vardır. Bu proteinler idrardaki inhibitör aminoasitlerin ana kaynağıdır. Diyetle alınan fazla şeker üst üriner sistemde taşa neden olabilir. Beslenme ile alınan yüksek miktarda şekerin renal tübül hücrelerinde asit yükünü artırarak idrar kalsiyumunu arttırdığı ve üst üriner sistem taşına yol açtığı ileri sürülmektedir. Alkol alımı ile de kanda ürik asit, idrarda kalsiyum, fosfat

düzeylerinde artış olduğu ileri sürülmektedir. Böylelikle alkol alışkanlığı olanlarda üriner sistem taş hastalığı riski normalden daha fazla olduğu düşünülmektedir.

Taş oluşumunda meslek de rol oynamaktadır. Büro hizmeti yapan sınırlı aktiviteye sahip kişilerde veya yüksek ısıda çalışanlarda daha yüksek oranda taş görülürken, aktif görevi olanlarda, tarım işçilerinde daha az rastlanır (21).

Diyet, aktivite ve heredite, taş oluşumu açısından birbirini tamamlamaktadır. Her biri primer bir faktör olarak etkilemese de birlikte etki göstererek taş oluşumunu kolaylaştırır.

2.2.2. Etiyoloji

Taş etiyojisi konusunda günümüzde taşın kimyasal yapısı ile ilgili yeterli bilgi sağlanmış ve teoriler öne sürülmüştür. Ancak bir çok faktörün bir araya gelmesi ile oluşan taş hastalığının etiyojisi halen tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Taş hastalığı cerrahi tedavisi konusundaki gelişmeler, etiyojik araştırmaları geride bırakmıştır (3,21).

Çoğu zaman taş oluşumu için multipl etiyojik faktörler bir arada yer alır. Süpersatüre bir idrar çözeltisinde kristalizasyon, kristal agregasyonu ve nükleasyon oluşsa bile, idrar akımının sürekliliğini ve düzenini bozacak bir anatomik bozukluk yoksa taş oluşma riski oldukça düşüktür. Ancak idrar stazı geliştiğinde, idrar transit süresinde artış ve diğer etiyojik faktörlerin kombinasyonu ile taş oluşma riski artar. Ayrıca bazı yapısal anomaliler, böbrek fonksiyonlarını etkileyerek inhibitör eksikliği oluşturup, taş oluşumunu hızlandırabilir.

Taş oluşumunda bazı predispozan faktörler yer almaktadır. Bunlar:

1. Konjenital anomaliler
2. Renal kalsifikasyonlar
3. İdrar pH'sındaki değişiklikler
4. Üriner sistemdeki yabancı cisimler
5. Üriner sistemle bağlantısı olan fistüller
6. Üriner sisteme ait maligniteler - nekrotik dokular
7. Yaygın üriner sistem infeksiyonları
8. Ürostaz

2.2.3. Taş Oluşum Mekanizmaları

Üriner sistemde taş oluşması, idrarda kristal olmasına bağlıdır. Bu kristaller, süpersatüre idrarda oluşur. Kristal bileşiminde yer alan kimyasalların idrarda ekskresyonunun artması kristalizasyonu arttırır. Ayrıca, taş oluşumu için idrarda sürekli olarak kristal

süpersatürasyonu olması gerekli değildir. İntermittan bir şekilde, dehidratasyon ya da gıda alımı sonrasında oluşan süpersatürasyon taş oluşumu için yeterlidir (21).

CaOx'un kristalizasyon potansiyeli kalsiyum ve oksalatın idrardaki toplam konsantrasyonundan ziyade iyonların kimyasal aktivitesi ile ilgilidir. Bunun nedeni, idrarın kompleks bir solüsyon olmasıdır. İnhibitör olarak adlandırabileceğimiz sitrat ve fosfat gibi maddeler, kalsiyum ile; magnezyum ve sodyum gibi elementler ise oksalat ile kompleks oluşturarak, her birinin serbest iyon konsantrasyonunu azaltırlar. Rekürren CaOx taşı geliştiren olguların idrarında yüksek kalsiyum ve oksalat satürasyonu varken, inhibitör düzeyleri düşüktür.

Oluşan kristallerin agregasyonu, taş oluşumundaki ilk aşamalardan biridir. Kristal agregasyonu, agregasyon inhibitörlerinin idrar konsantrasyonuna bağlıdır. İdrar glikoproteinleri; nefrokalsin ve Tamm-Harsfall proteini, basit solüsyonlarda kristal agregasyonunun potent inhibitörleri iken, sitrat ve magnezyum, kristal gelişiminin inhibitörleridir.

Medüller sünger böbrek, üreteropelvik bileşke tıkanıklıkları ya da tübüler epitelyumun yapışkanlığının arttığı durumlarda kristal birikme riski artar. Kanıtlanmamış olmasına rağmen, bakteriyel infeksiyonlar, idrar matriksini artırarak kristalin yapışmasını hızlandırır ve CaOx taşı oluşma riskini artırır.

Taş oluşum etiyojisini izah etmek için süpersatürasyon-kristalizasyon, idrar inhibitörlerinin yokluğu, matriks-nükleasyon (çekirdekleşme) ve epitaksi teorisi gibi teoriler ortaya atılmıştır. Bunun yanında bu dört mekanizmayı birleştiren kombine teori ve aynı zamanda; intranefronik ve fiks nükleasyon, ekstranefronik ve serbest parçacık nükleasyonu gibi kombine teoriler de ileri sürülmüştür.

2.2.3.1. Süpersatürasyon – Kristalizasyon Teorisi

Süpersatürasyon, taş oluşum mekanizmasının en önemli basamağıdır. Belirli bir pH ve sıcaklıktaki suya kristalize olabilecek bir element konulduğunda, solüsyon halinde kalır. Ancak bu elementin miktarı arttırılırsa, belirli bir doygunluğa ulaştıktan sonra artık eriyik halinde kalması mümkün değildir ve doymuş haldeki madde kristalize olmaya başlar. pH ve sıcaklık, elementlerin solüsyonda erime düzeyinde ve kristalizasyonun başlamasında belirleyicidir. Vücut sıcaklığının 37°C olup değişmemekle birlikte, idrar pH'sında değişiklikler sık görülmektedir (21).

Bir solüsyonda kalsiyum ve oksalat gibi iki madde varsa satürasyon düzeyini o maddelerin konsantrasyonları belirler. Bu iki maddenin satürasyonu artırıldığında belirli bir noktadan

sonra kristalizasyon başlar. Madde için özgül satürasyon noktasına “solubility product” adı verilir.

Bir elementin sudaki satürasyonunu ve solubility product’ını tespit etmek kolaydır, fakat idrar, karışık ve kompleks bir solüsyon olduğundan suya göre daha fazla elementi solüsyon halinde tutabilme özelliğine sahiptir ve sadece elementin idrardaki miktarı ile satüre hale gelemmez. Ayrıca idrar içerisindeki sitrat gibi bazı organik inhibitör maddeler kalsiyum ile birleşerek kalsiyum sitrat oluşturur ve CaOx formasyonunu engeller. Sitrat eksikliği ise kalsiyumun oksalat ile birleşmesine, yani taş oluşumuna zemin hazırlar. Asidik idrarda sistin veya ürik asidin doymuşluk sınırını aşması kolaylaşır ve ürik asit ve sistin taşları oluşur. Yine alkali idrar magnezyum, amonyum ve fosfat iyonlarının doymuşluk sınırının aşmasına ve sitrüt taşlarının oluşmasına neden olur. Doymuşluk sınırının aşıldığı ve kristalizasyonun başladığı bu noktaya “formation product” adı verilir. Solubility product ve formation product arasındaki satürasyon bölgesine ise “metastable region” adı verilmektedir. Bu noktada yeni spontan kristal nüvesi oluşmasa da, daha önceden oluşan kristal nüvesi üzerinde taş oluşabilir. Daha önce oluşmuş olan kristaller agregale olabilir.

Bir diğer teoriye göre iyonların aşırı konsantrasyonu sonucunda papilla, papilla yüzeyinin hemen altı ve tüp hücrelerinde kristal presipitasyonu veya ufak kristal kürecikleri oluşabilir. Bunlar, oluşacak taşlar için nükleus rolü oynar. İdrarda serbest olarak yüzen nükleus ve kristal kürecikleri kolayca atılabilir. Ancak yüzeydekiler nükleus rolü oynarak kristal büyümesine ve taş oluşumuna sebep olabilir.

2.2.3.2. İnhibitör Eksikliği Teorisi

İki ayrı insan grubunda aynı miktar ve yapıda sistin, ürik asit kalsiyum ve oksalat bulunmasına rağmen bazı olgular taş oluşurken bazılarında oluşmamaktadır. Bu duruma farklı inhibitörlerin eksikliği sebep olabilir (21).

İdrarda kristalizasyonu önleyen bazı inhibitör maddeler vardır. Bunlardan düşük molekülü peptidler, yüksek molekülü glikoproteinler, matriks-A maddesi, matriksin yüzeyindeki elektrik içeren zeta potansiyel, sülfidril bağı içeren üromukoidler, alanin, sitratlar, hatta ürik asidin erimesini sağlayan üre gibi maddeler organik inhibitörlerdir. Fosfatlar, pirofosfatlar, pirofosfat eliminasyonunu artıran ortofosfatlar, magnezyum ve eser element çinko kristalizasyonu önleyen inorganik inhibitörlerdir. Taş oluşan bireylerde süpersatürasyon-kristalizasyona, idrardaki inhibitör maddelerin eksikliği de eşlik edebilmektedir.

2.2.3.3. Matriks – Nükleasyon Teorisi

Matriks; protein, heksan ve heksaminlerden oluşmaktadır. Proksimal tübül hücrelerinde yapılır ve idrar proteinlerinin bir ürünüdür. Matriks bir taraftan kristal büyüme ve agregasyonunu engellerken, diğer taraftan taş yapısına katılabilir. Taş yapısında %2-10 oranında görülebilir. Kalsiyum içeren taşların %3'ünde, ürik asit taşlarının %2'sinde ve matriks taşlarının %65'inde matriks izlenir. Ayrıca matriks yapısına üromukoid, albumin, globulin ve nadiren gamma globulinler de girebilir ve matriks görevi görebilir (21).

Bu matriks benzeri proteinler 1684 yılında Von Heyde tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra Boyce tarafından matriksin taş oluşumundaki etkisi bildirilmiştir. Üriner sistem taşlarının tümünün yapısında matriks bulunmaktadır. İdrarda bulunan yabancı cisimler, epitel döküntüleri, eritrosit, lökosit gibi hücreler de matriks gibi davranarak üzerlerinde kristalizasyon ve agregasyon oluşturabilirler. Nadir olarak enfeksiyon bulunan veya zayıf fonksiyona sahip böbreklerde sadece matriksten oluşan taş izlenebilir (3).

2.2.3.4. Epitaksi

İdrarda oluşan kristalizasyonu takiben kristal oluşan madde konsantrasyonu azalacağı için kristalin büyümesine imkan kalmamaktadır. Ancak başka bir yüksek saturasyonda element var ise ilk oluşan kristal üzerine yapışarak farklı dış tabakaya sahip bir taş oluşabilmektedir. Bu durum epitaksi olarak adlandırılır. Ürik asit kristalleri üzerine CaOx kristalleri, kolaylıkla epitaksi ile tutunabilmektedir (21).

2.2.3.5. Kombine Teoriler

2.2.3.5.1. İntranefronik ve Fiks Nükleasyon

İntranefronik ve fiks nükleasyon teorisine göre kristalizasyon aşamasında ilk çekirdek tübül hücrelerinde oluşmaktadır. Çekirdek tübül lümenine atılır ve serbest kristal çekirdekleşmesine gerek yoktur (21).

2.2.3.5.2. Ekstranefronik ve Serbest Partikül Nükleasyonu

Standart kristalizasyon fiziksel kuralları ile statik bir solüsyonda kristal oluşumu açıklanabilse de, in vivo oluşan idrar statik bir solüsyon değildir. İdrar glomerüllerden nefronlar yolu ile pelvikalisiyel sisteme 2-5 dk gibi bir sürede geçer. Papillada oluşan kristaller 3-5 dk içinde pelvise aktarılabilmektedir. İdrarın böbrekten mesaneye geçiş süresi ise 5-10 dakika kadardır. Finlayson ve ark'nın 1978'de oluşturduğu modele göre serbest partikül taş oluşumu, matematiksel olarak imkansızdır. Ancak 1994 yılında Kok ve Khan'ın

güncel nefron boyutu, süpersaturasyon ve kristal büyüme hızları ile oluşturduğu modelde, böbreğin olağan aktarım süresi dahilinde de taş oluşabileceği gösterilmiştir (3,21)

2.2.3.5.3. Kombine Teori

Kombine teoride, süpersaturasyon-kristalizasyon, idrar inhibitörlerinin yokluğu, matriks-nükleasyon ve epitaksi teorileri hep birlikte ele alınmaktadır, ancak taş oluşması için böbreğin, kristalize olabilecek maddelerin yeterli miktarlarda atacak ve pH'yı düzenleyebilecek düzeyde olması gerektiği de ifade edilmektedir. Fakat her olgularda yukarıdaki mekanizmaların biri belirlenemez. Bunlara idiopatik taş hastalığı adı verilir. Bu grupta en çok kalsiyum içeren taşlar bulunur. Kalsiyum içeren taşların %30-40'ı idiopatik gruptadır.

Sonuç olarak böbrekteki hücre sel kalsiyum ya da oksalat metabolizmasındaki anormallikler, intrasellüler ya da interstisyel kristal depolanmasına ve taş oluşumuna sebep olabilir. Taş hastalarının renal papillaları incelendiğinde CaOx ve ürik asit taşı olanların tamamında papillar plaklar (Randall plakları) varken, strüvit taşı olanlarda yalnızca % 20 oranında plak olduğu görülmüştür (5,25)

2.3. Genel Bilgiler – Deney Modeli

Değişik çalışmalarda hayvan modellerinin kullanılmasının nedeni kompleks bir sürecin ayrı kısımlara bölünerek incelenebilmesini sağlaması yanısıra, bir bütün olarak da ele alınabilmesine izin vermesidir. İyi modeller, komplike olmayan ve değişik hipotezlerin denenebilmesine olanak sağlayan modellerdir.

2.3.1. Sıçan Üriner Sistem Taş Modeli

Nefrolitiazis çalışması için tavşanlar ve köpekler de kullanılmıştır, ancak en sık tercih edilen hayvan modeli sıçan modelleri olmaktadır. İzole CaOx ve kalsiyum fosfat ile birlikte CaOx taşları tüm dünyada %80'e yaklaşan yüksek bir orana sahip olduğu için, CaOx taş hastalığı daha detaylı olarak çalışılmaktadır (3).

Hayvan ve insan böbrekleri arasında bazı anatomik farklılıklar bulunmaktadır (26). Hayvan böbrekleri daha küçük, tek papillalı, daha az sayıda tübüle, daha basit bir pelvise ve küçük bir üriner alana sahiptir. Ancak, medulla-korteks oranı hem sıçan hem de insanlarda 1:2 olarak benzerlik göstermektedir.. İnsan böbreğinde 5-6 papilla yer alırken, sıçan böbreğinde 1 papilla yer almaktadır. Sıçan böbreğinde insan böbreğinden çok daha az sayıda, 30000-31000 nefron yer almaktadır. Sıçan böbreğinin ortalama ağırlığı 0,75 – 1,2 gr olarak izlenmektedir. Tüm bu farklılıklar nedeniyle, basit ve küçük bir pelvise sahip sıçan böbreğinde oluşan taşlar,

insanlarda olduğu gibi büyük staghorn benzeri taş boyutlarına ulaşamamakta, ancak minyatür birer taklit olmaktadır.

Sıçanlarda spontan üriner taş oluşumu çok nadirken, spontan üst üriner sistem CaOx taşı oluşumu ise izlenmemektedir. Sıçanlarda CaOx böbrek taşları, akut veya kronik hiperoksalüri oluşturularak sağlanmaktadır. Kullanılan hiperoksalürik ajanlar arasında sodyum oksalat, amonyum oksalat, hidroksi-L-prolin, glikolik asit ve etilen glikol (EG) yer almaktadır. Hiperoksalürik ajanlar aynı zamanda D vitamini veya azaltılmış magnezyum içeren diyet ile kombine edilebildiği gibi, pH düşüren amonyum klorür (AC) ile birlikte de kullanılmakta ve hiperkalsiüri oluşturulmaktadır.

Sıçanlarda hiperoksalüri oluşturmak için kullanılan en basit yöntemlerden birisi hayvana içme suyu ile EG vermektir. Bu durumda EG bağırsaklarda emilerek karaciğerde oksalata metabolize olmaktadır (27). Oral verilen %0,75-1'lik EG'yi takiben ortalama 2. günde üriner oksalat miktarında artış izlenmekte, 2 hafta içinde persistan kristalüri başlamakta, 3 hafta içerisinde de böbreklerde kristal depozitleri görülmektedir (6). İçme suyuna eklenen AC ile idrar asidifikasyonu ve hiperkalsiüri sağlanarak, bu süreler 3. günde kristalüri gibi çok daha kısa aralıklara indirilebilmektedir.

CaOx taşı modelinde gerçekleştirilen çalışmalar erkek sıçanlar üzerinde yapılmaktadır. Düşük konsantrasyonda uygulanan EG sonucunda erkek sıçanlarda elde edilen CaOx nefrolitiazisi, dişi sıçanlarda farklı sonuçlar vermektedir. Dört hafta süresince uygulanan EG %1'lik sonucunda 13 erkek sıçanın 3'ü taş oluştururken, 12 dişi sıçanın hiçbirinde taş izlenmemiştir. Üriner asidifikasyon ile bu oranlar erkek sıçanlarda 5/6'ya ve dişi sıçanlarda 1/9'a yükselmiştir (28). Başka bir çalışmada erkek sıçanlarda %0,2'lik EG uygulanması CaOx taşı oluşturmada yeterli bulunurken, dişi sıçanlarda %1 veya daha yüksek konsantrasyonda EG uygulanması gerekli bulunmuştur. Konu ile ilgili olarak, %0,5 EG ile erkek ve dişi, normal ve gonadektomi uygulanmış sıçanlarda çalışma gerçekleştirilmiştir. Normal erkeklerde 5/7 taş izlenirken, kastre erkeklerde 1/7 oranında taş izlenmiş, dişilerde ise taş izlenmemiştir (29). Bu durum, testosteronun bu farklılıkta rol oynadığını göstermektedir.

Kronik hiperoksalüride, renal papiller uç ve kaliksler CaOx kristallerinin sık yerleştiği noktalar. Renal korteks ve diğer böbrek alanlarında kristal yerleşimi görülmesi, üriner oksalat miktarının artması ve hiperoksalürik sürenin uzaması ile artış göstermektedir.

AC, klinik pratikte ciddi metabolik alkalozun tedavisinde kullanılmaktadır. Deney modelinde sıçanlara içme suyu ile verilen AC, idrar pH'sını ve sitrat miktarını düşürmekte ve hiperkalsiüri oluşturmaktadır. Ayrıca AC, deney modelinde böbreklerde oluşan CaOx kristalizasyonunun şiddetini arttırmaktadır (26).

2.3.2. Oksalat Metabolizması

Oksalat bir metabolizma ürünüdür ve idrarda kalsiyum ile birleşerek erimesi güç olan CaOx tuzunu oluşturmaktadır (21). İnsan metabolizması içinde yer alan oksalatın sadece %10-15'i diyetle alınırken, geri kalan %85-90 ise endojen kaynaklıdır. Oksalat en çok yeşil yapraklı sezewer, limon, siyah üzüm, kızılıık, erik, çay, kako, badem, ceviz, karbonatlı içecekler ve kahvede bulunur. Normal diyetle alınan oksalatın sadece %10-15'i barsaklardan emilirken, yarısı kolonda bakteriyel çözünmeye uğrayarak, %25'i de hiç değişikliğe uğramadan dışkıyla atılır. Barsak lümeninde yer alan kalsiyum miktarı oksalat emilimini etkilemektedir. Barsaktan emilen ve endojen olarak üretilen oksalat oldukça çözüner olup hiçbir değişikliğe uğramadan idrar ile atılır. İdrarla günlük atılan oksalat miktarı 40 mg olup bu değerin üzeri hiperoksalüri olarak kabul edilir. Hiperoksalüri yapan sebepler 4 başlıkta incelenebilir (3):

- 1- Primer Hiperoksalüri
- 2- Enterik Hiperoksalüri
- 3- Diyete Bağlı Hiperoksalüri
- 4- İdiyopatik Hiperoksalüri

2.3.2.1. Primer Hiperoksalüri

Otozomal resesif bir hastalık olan primer hiperoksalürinin tanımlanan başlıca 2 tipi vardır.

Tip 1: Otozomal resesif geçişli olup karaciğerde glioksalat aminotransferaz enzimidaki defekte bağlı aşırı oksalat üretimi vardır. Prenatal tanısı, perkütan yolla fetal karaciğer biyopsisi ile veya koryonik villusların DNA analizi ile konabilir. Fatal seyreder ve genelde hastalar 40 yaş öncesi böbrek yetmezliğinden ölürlür.

Tip 2: Glioksalat redüktaz enzimlerindeki defekte bağlı üriner Ca ve oksalat atılımında artış vardır. Oldukça nadirdir.

Her iki tiptede erken çocukluk çağında nefrokalsinozis, tubulointerstisyel nefropati ve kronik böbrek yetmezliği ortaya çıkar. Tedavisinde yüksek doz (100-400 mg) piridoksin verilerek üriner oksalat atılımı ve karaciğer üretimi azaltılabilir. Oral sitrat, tiazidler, nötral fosfatlar ve magnezyum-glukonat ile hiperoksalüri kısıtlı düzeyde önlenabilir. Böbrek transplantasyonu uygulanmaz, çünkü transplante edilen böbrekte kısa sürede oksalat birikimi görülmektedir. Bu hastalarda karaciğer transplantasyonu deneme aşamasındadır (3,21).

2.3.2.2. Enterik Hiperoksalüri

Hiperoksalürinin en sık nedenidir. Oksalatın barsaklardan hiperabsorbsiyonu ile ilgili olduğu düşünülen 2 faktör bulunmaktadır. Safra ve yağ asitleri kolonik barsak mukozasının oksalata geçirgenliğini arttırabilmektedir. İleal hastalıklarda oluşan yağ malabsorbsiyonu kalsiyum-sabun oluşumunu arttırarak serbest oksalatın artmasına neden olup absorpsiyonunu arttırabilir. Kronik diyare olan olgularda dehidratasyon, hipokalemi, hipomagnezürü, hipositratürü ve düşük idrar pH'sı CaOx taşı oluşmasını kolaylaştırır. Ayrıca incebarsak rezeksiyonu, malabsorbsiyon ve jejunoileal bypass gibi durumlar da hiperoksalüri ile ilişkilendirilmiştir (3,21).

2.3.2.3. Diyete Bağlı Hiperoksalüri

Oksalattan zengin gıdalarla beslenme, normal bireylerde hiperoksalüri oluşturabilmektedir. Hayvansal proteinlerden zengin beslenme, idrar oksalat ve kalsiyumunu arttırmaktadır. Kalsiyum alımında kısıtlama, barsakta emilebilir serbest oksalatı arttırdığı için hiperoksalüriye yol açmaktadır. Antifriz olarak kullanılan EG, yanlılıkla tüketildiğinde süratle glioksalat ve oksalata dönüşerek masif oksalüri oluşturur ve tübüler obstrüksiyonla akut böbrek yetmezliğine neden olur. Askorbik asit destek tedavisinin günde 5 gr'dan fazla ve uzun süre alınması ile askorbik asidin in vivo oksalata dönüşümü sebebi ile hiperoksalüri ve taş oluşumuna sebep olabilir (3).

2.3.2.4. İdiyopatik Hiperoksalüri

Bir çok çalışma, hafif hiperoksalürinin de CaOx taşlarının patogenezinde en az hiperkalsiüri kadar önemli olduğunu bildirmiştir. Kalsiyum taşı bulunan olguların %0,3-50'sinde üriner oksalat atılımı artmıştır. Hafif metabolik hiperoksalürisi olan hastalarda piridoksinin, oksalat ekskresyonunu %50 azalttığı bilinmektedir (3).

2.3.3. Renal Hasar Oluşumu

2.3.3.1. Hiperoksalüriye Bağlı Hasar

CaOx taşı oluşumunda, hiperoksalürinin renal hücrelerde oluşturduğu harabiyet önemi rol oynamaktadır. Oksalat iyonları ve CaOx kristalleri, renal epitelyal hücrelerde, özellikle renal tübüler hücrelerde hasar oluşturmaktadır. Deneysel hayvan modellerinde kristalüri izlenmeden de hasarın izlenmesi, oksalat ile ilişkili oluşan bu hasarın sadece CaOx kristallerine bağlı olmadığını ve oksalat iyonlarının da büyük rol oynadığını göstermektedir (4). Oluşan bu hasar, değişik derecelerde morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler, hücresel

proliferasyonda ve konsantrasyonda artış ve bunu izleyen planlanmış hücre ölümü şeklinde olmaktadır. Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda hücre ölümü nekroz şeklinde tanımlanmış olsa da, son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar hücre ölümünün apoptozis ile gerçekleştiğini ortaya çıkarmıştır.

Hasarın gelişmesinde, tübüler iskemik değişiklikler ve serbest oksijen radikali (SOR) oluşumu önem taşımaktadır. Renal kan akımı yapısı nedeniyle, distal tübüllerde ve papiller uçtaki dolaşım hiperozmolarite, düşük O₂ ve yüksek CO₂ oluşturmakta ve bu durum da epitel hücrelerinin toksik hasarını kolaylaştırmaktadır (30). İnsanda bu alanda oluşan plakların operatif biyopsiler ile elde edilen histolojik incelemelerinde, Randall plağı olarak adlandırılan yapıların Henle'nin ince kolundan başlayarak papiller interstisyel alana devam ettiğini göstermektedir. Randall'ın hipotezine göre, oluşan bu plak yapıları özellikle klinik pratikte en sık karşılaşılan idiyopatik CaOx taşı oluşumu için bir nidus oluşturmaktadır (25). Operatif nefroskopi görüntülerinin karşılaştırıldığı bazı çalışmalarda, idiyopatik CaOx taşlarının bu plaklardan köken aldığı saptanmıştır. Ayrıca üreteroskopik görüntüler ile gerçekleştirilen ve serbest taşların incelendiği farklı bir çalışmada, taşların yarısında konkav ve mukus kaplı bir alan saptanmıştır. Bu alanda saptanan apatit göz önünde bulundurulduğunda, bu taşların plaklara bağlı geliştikten sonra ayrıldığı öne sürülmektedir (5).

2.3.3.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Hiperoksalüri renal hücrelerde asidik pH ve ödem gelişimi nedeni ile hücre içi kalsiyum miktarını artırarak fosfolipaz aktivasyonunu ve araziidonik asit üretimini hızlandırmaktadır. Bunun sonucunda mitokondriyal enzimler inhibe olur ve SOR miktarı hem artar hem de SOR aktifleşmesinde artış olur. SOR, süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit (NO) ve hidroksil radikali şeklinde ortaya çıkan serbest radikaller değişik ürünlerden meydana gelmektedir. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri, bu konuda en büyük kaynağı oluştururken, endoplazmik retikulum ve nükleer membrandan da üretilmektedirler. Ayrıca aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofiller de serbest radikaller üretmektedir. Bu hücrelerin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon ve vitamin E ve C üzerinden kendilerini korudukları antioksidan sistemleri bulunmaktadır. Endoplazmik retikulum membranında yerleşen sitokrom p450 molekülünde süperoksit radikali üretebilmektedir. SOR üretimi sürekli bir üretim şeklinde bazal bir düzeyde tutulur ve denge halinde bulunduğu sürece problem oluşturmaz. Bu denge bozulduğunda hücre organellerinin membranlarında lipid peroksidasyonu başlar ve hasar oluşturarak hücreyi ölüme kadar götürür. Lipid radikallerinin artışı kendi üretimlerini de arttırmaktadır ve sonuçta hasar daha büyük bir hale

gelir. Lipid peroksidlerinin yıkımı ile aktif olan aldehitlerden malondialdehit (MDA) meydana gelir. MDA ölçümü oksidatif stres hakkında bilgi vermektedir. Serbest radikaller lipidler dışında proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve DNA için etkileyici olup bu yapıları bozarlar ve hücreye zarar verirler (31,32).

Antioksidanlar olarak vitaminler, ilaçlar, gıdalar, enzim olan ve olmayan moleküller bulunmaktadır. Enzim olanlar içinde SOD'un, süperoksit serbest radikallerinin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu olduğu ve fagosite edilen bakterileri öldürmede görev yaptığı bilinmektedir. Glutasyon peroksidaz ise membranda fosfolipid hidroksiperoksidlerin alkollere indirgenmesini sağlar. SOD ile benzer şekilde fonksiyon göstermektedir. Katalaz ise hidrojen peroksidleri ortadan kaldırarak hücrenin korunmasına yardımcı olmaktadır (33).

Hiperoksalüri ile oluşan hasarda damarsal bozukluk ve özellikle endotel hasarına bağlı olarak daha fazla serbest radikalın ortaya çıkması ile NO dengesizliği oluşmakta ve inflamasyona neden olmaktadır. Hasarın oluşmasında sitokinler gibi inflamatuvar mediyatörler rol oynamaktadır ve aktive olan kompleman sistemi ile hem sitokinler hem de öncül inflamatuvarları artırılarak lökositler aktive edilir. Polimorf nüveli lökositlerin SOR, sitotoksite, vasküler geçirgenlik artışı ve sitokinlerin desteği ile aktivasyon ve migrasyonları sağlanır, ayrıca adhezyon molekülerinin yardımı ile hasarlı bölgeye göçleri oluşmaktadır. Burada prostoglandin ve lökotrien üretimi, lizozomal aktivite ve SOR oluşumu üzerinden savunmanın yapılmasını sağlamaktadır (34).

Oluşan hasar tübüllerde hücre dökülümü şeklinde görülür ve akut böbrek yetmezliği oluşmaktadır. Vazokonstriksiyon sonrasında hücre içi kalsiyum artışı nedeniyle artan proteaz ve fosfolipazlar hasarı büyütmetedirler. Hipoksi ve inflamasyonun devamı ile medullanın dış kısmında eritrosit ve lökosit infiltrasyonu olur. Hücre adezyon moleküllerinde artış görülür. Tübüler hasar aşamasına gelindiğinde oksidatif stresin etkisi daha da belirginleşmekte, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve NO düzeylerinde artış izlenmektedir.

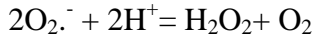
2.3.3.2.1. Nitrik Oksit

NO, renal oksidatif stres patofizyolojisinde önemli bir mediatördür. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L-arginin ve hücrel oksijenden sentezlenmektedir. Endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve iNOS olmak üzere üç tip NOS bulunmaktadır. eNOS ve nNOS dokuda oldukça düşük düzeyde bulunmakta ancak hücre içi Ca^{+2} düzeyinin artışı ile kalmodulin varlığında artış göstermektedir. iNOS ise tümör nekroz faktör-alfa, interferon-gama gibi sitokinler tarafından makrofajların aktivasyonu ile indüklenmektedir. NOS

aktivasyonu, serbest radikaller oluşturarak mitokondrial fonksiyonları bozmakta ve deoksiribonükleik asit (DNA) yıkımı ile direkt hücre ölümlerine sebep olmaktadır (35).

2.3.3.2. Süperoksit Dismutaz

SOD, bakır içeren intrasellüler enzimatik bir antioksidan olup, son derece etkin olup hücre hasarına yol açan süperoksitin hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalizlemektedir (33). Hidrojen peroksit ise daha sonra glutatyon peroksidaz ve katalaz tarafından moleküler oksijen ve suya dönüştürülerek temizlenir. SOD'un katalizlediği reaksiyon şu şekilde ifade edilebilir.



Ayrıca SOD'un enziminin bir diğer görevi de dehidrataz enzimler olarak adlandırılan dihidroksi asitdehidrataz, akonitaz, 6-fosfoglukonat dehidrataz ve fumaraz A ve B üzerinden süperoksit radikallerinin inaktivasyonunu sağlamaktır. Oksidatif stresin artması ile SOD düzeylerinde artış izlenmektedir (36).

2.3.3.2.3. Malondialdehit

MDA, hücre lipidlerinin okside olması sonucu oluşan ana metabolittir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonundan meydana gelmektedir. MDA, proteinlerin ve fosfolipidlerin arasında çapraz bağlar oluşturarak membranda polimerizasyona, iyon taşınmasının ve enzim işlevlerinin olumsuz yönde etkilenmesine neden olur. Hücre membran stabilizasyonunun bozulması, hücrenin membran potansiyeli oluşturabilme yeteneğine zarar vererek hücre içerisinde kalsiyum artışına neden olur. SOR ile lipidlerin peroksidasyonundan oluşan MDA'nın düzeyi, hücrede oluşan oksidatif hasarın derecesini belirleyebilmektedir (37).

2.3.3.3. Apoptozis

Planlanmış bir şekilde gerçekleşen hücre ölüm tipine "apoptozis" adı verilmektedir. İlk kez 1973 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Apoptozisin onkolojik rolü saptandıktan sonra daha büyük önem kazanmıştır (38).

Apoptozis, ilk tanımlanmasından beri programlanmış hücre ölümü şeklinde ifade edilmesine rağmen son yıllarda yapılan çalışmalar ile programlanmış hücre ölümünün iki tipinin olduğu bulunmuştur:

1 - Apoptotik programlanmış hücre ölümü: Apoptozisin tüm morfolojik özellikleri izlenmektedir. Yenidoğanda gerçekleşen timus involüsyonu apoptotik programlanmış hücre ölümüne klasik bir örnektir.

2 - Nonapoptotik programlanmış hücre ölümü: Programlanmış bir ölüm olmasına rağmen apoptozisin klasik morfolojik değişikliklerini taşımaz. Nonapoptik hücre ölümünün de en klasik örneği, fetal hayatta varolan parmak arası perdelerin ortadan kaybolmasıdır. Ancak her iki tipte de; ölüm öncesi de novo gen ekspresyonu gerekmektedir.

Nekroz, hücre ölümünde önemli bir başka yol olmasına rağmen, apoptozis ile oldukça farklıdır. Apoptozis için de novo gen ekspresyonu ve enerji gereklidir. Gerekli bir basamak olarak DNA'yı parçalayan endonükleazlar sentezlenmektedir. Ayrıca apoptozis bu şekilde sinyale cevap verebilecek olgunluğa ulaşmış hücrelerde görülebilmektedir. Nekroz gelişmesi için hücrede bu şekilde bir diferansiyasyon gerekmez.

Apoptozisin karakteristik evreleri;

- 1- Hacim kaybı: Hücre hacminde yaklaşık %30 azalma görülür. Bu olaya H^+ ve Na^+ iyonlarını karşılıklı değiştiren pompanın bloke olmasının neden olduğu düşünülmektedir. Nekrozda ise tam tersine hücrede hacim artışı vardır.
- 2- Kromatin kondansasyonu: Çekirdekte sitoplazmaya paralel bir kromatin kondansasyonu görülmektedir. Kromatin ağı genellikle nükleer membrana birleşik, sıkı granüler yapılar oluşturmaktadır. Nükleoluslarda büyüme izlenir. Kromatin ağları kalınlaşır. Nekrozda ise benzer şekilde piknoz görülse de kromatin ağının uniform bir şekilde kondansasyon yaptığı izlenir.
- 3- Sitoplazmik değişimler: Sitoplazmik hacim kaybının yanında hücrede mikrovilluslar oluşmaktadır. Bu evrede epitelyal hücrelerde desmozomlar ayrılır. Sitoplazmada vakuoller belirmeye başlar. Apoptozisin sürdürülmesi için enerji ihtiyacı olması nedeniyle son evreye kadar sitoplazmik organeller olağan izlenir. Nekrozda ise organellerin kaybı ön plandadır ve ilk aşamalarda ortadan kaybolurlar.
- 4- Çekirdek parçalanması: Çekirdeğin parçalanmasını, sitoplazmaya dağılan DNA içeriğinin endonükleazlar tarafından kırılması izler. Nekrozda ise karyolizis meydana gelmektedir, çekirdek eriyerek gözden kaybolur.
- 5- Apoptotik yapıların oluşumu: Bu evrede sitoplazmik zarla çevrili olan ve içinde organeller, çekirdek fragmanları ve vakuoller barındırabilen apoptotik yapılar oluşmaktadır.
- 6- Fagositoz: Bu evrede apoptotik yapılar çevre dokular tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır. Apoptotik yapılar membranla kaplı olduğundan hücre ölümü nedeniyle oluşabilecek kemotaktik özellikli maddeler intersellüler alana salınarak inflamasyon geliştirmezler. Nekrozda ise sitoliz sonucu ortaya çıkan kemotaktik maddeler inflamasyona neden olur.

Apoptozis yaklaşık 2-3 saat içinde tamamlanır ancak bazı hücrelerde apoptozis 20 dakika gibi kısa sürelerde tamamlanabilmektedir. Apoptozisin bazı hücrelerde bu kadar hızlı gerçekleşebilmesi, apoptozis için gereken proteinlerin hazır halde olması ile açıklanmaktadır (39).

2.3.4. Sildenafil Sitrat

Sildenafil sitrat, siklik guanozin mono fosfat'ı (cGMP) yıkan enzim olan PDE tip 5 enzimini inhibe ederek cGMP'yi artırır. Sildenafil sitratın moleküler yapısı cGMP'ye benzer yapıdadır ve kompetitif inhibisyon yapmaktadır. Sildenafil sitrat, 1980'li yıllarda antianjinal tedavi olarak denenirken, uygulanan hastalarda ereksiyon yan etkisi oluşturmuştur. Bu etki dikkati çekmiş ve erektil disfonksiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Cinsel uyarı ile artan NO seviyeleri, guanilat siklazı uyarır ve cGMP düzeyleri artarak düz kas gevşemesi ve vazodilatasyon sağlanır. Sildenafil sitrat ise PDE 5'i inhibe ederek korpus kavernozumdaki cGMP düzeyini artırır ve bu da vazodilatasyona ve kan akımında artmaya neden olur. PDE 5 aynı zamanda düşük seviyede retina hücreleri gibi diğer dokularda da bulunmaktadır. Trombositlerden trombüs oluşumunu inhibe etmektedir ve vazodilatasyona neden olur. Bu etki spektrumu ile sildenafil sitrat çeşitli amaçlarla kullanılmıştır. Vazodilatasyon etkisi nedeniyle pulmoner hipertansiyonda kullanılmıştır. Antianjinal ve vazodilatatör etkisinin yanısıra kardiyovasküler yan etkilere sahiptir. Vazodilatatör etkiye rağmen insanlarda myokard kontraktilesinde artış veya aritmi gibi yan etkiler saptanmamıştır. Klinik kullanımda hipotansif etkiye bağlı olarak oksijenizasyonda azalma ve sistemik hipotansiyon, hayvan modellerinde ise aortik kan basıncında artma, segmental renal arterlerde maksimal hızda düşme görülmüştür (40).

cGMP'ı degrade eden iki PDE için yüksek afinite gösteren bir PDE izoenzim seçici inhibitörü olan sildenafil sitrat ile ilgili, özellikle renoprotektif etkilerinin odaklandığı deneysel çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Renal iskemi/reperfüzyon hasarında, deoksikortikosteron asetat ile oluşturulan mineralokortikoid hipertansiyonu ve renal disfonksiyon modelinde, streptozosin ile oluşturulan diyabetik nefropati modelinde sildenafil sitrat'ın hücre hasarını ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (7-9). Ancak hiperoksalüriye bağlı oluşan renal hasarın engellenebilmesi konusunda sildenafil sitrat ile ilgili güncel literatürde veri yer almamaktadır.

2.3.5. Potasyum Sitrat

Çalışmamızda kullanmayı planladığımız diğer molekül olan KCit, üroloji klinik pratiğinde CaOx ve ürik asit taşı gibi olgularda rekürrens önüne geçilmesi için 25 yılı aşkın süredir

kullanılan önemli bir ajandır. Etki mekanizması, idrar pH ve sitrat seviyelerinin arttırılması olarak özetlenebilir. Marnie ve ark.'nın 2009'da gerçekleştirdiği kısa ve uzun dönem tedavileri de kapsayan bir çalışmada, ortalama 41 aylık tedavi sürecinde, tam taş remisyonu gösteren olguların oranı %68 ve taş oluşum oranında %93 azalma bulunmuştur (41). KCit, distal renal tübüler asidoz olgularında metabolik asidoz ve hipokaleminin tedavisinde kullanılmaktadır. Tiazid diüretiklerine bağlı gelişen hipokalemi ve hipositratürde, idiopatik hipositratürde endikedir. KCit oral olarak alındıktan sonra, vücutta alkali yük artar ve bu yol ile üriner pH arttırılır. Ayrıca KCit, sitrat klirensini değiştirerek üriner sitratı arttırır. İdrar potasyumu artar. Bazı olgularda idrar kalsiyumunda azalma bildirilmiştir (3). KCit, taş oluşturan tuzların kristalizasyonunu engellemektedir. İdrar sitratının artması ile birlikte, kalsiyum bağlanmakta ve kalsiyum iyon aktivitesi kısıtlanmaktadır. KCit'in üriner oksalat konsantrasyonu üzerinde etkisi yoktur. Hiperkalemi yapmaktadır ve gastrointestinal yan etkilere sahiptir.

3. YÖNTEM

3.1. Hayvanlar ve Anestezi

Celal Bayar Üniversitesi (C.B.Ü.) Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu Onayı alındıktan sonra başlanan çalışma; C.B.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deneysel Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında gerçekleştirildi. C.B.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deneysel Cerrahi ve Araştırma Laboratuvarından temin edilen, seksüel olgunluğa erişmiş 50 adet erkek, hastalığı olmayan, ağırlıkları 190-230 gr arasında değişen Wistar Albino cinsi sıçanlar, 22°C ± 3°C oda ısısında ve 14 saat aydınlık ve 10 saat karanlık dönemlerle, serbest su ve gıda sağlanarak çalışmaya alındı. İntraperitoneal xylazine (6 mg/kg) ve ketamin (75 mg/kg) ile genel anestezisi altında cerrahi işlem gerçekleştirildi.

3.2. Deneysel Model ve Cerrahi İşlem

50 adet hastalığı olmayan erişkin erkek sıçan; negatif kontrol grubu (NK; normal içme suyu alan grup), taş grubu olarak da adlandırabileceğimiz pozitif kontrol grubu (PK; içme suyunda litojen bulunan), koruyucu tedavi grupları olan sildenafil sitrat (SS; 1 mg/kg/gün sildenafil sitrat ve içme suyunda litojen bulunan) grubu, KCit (PS; 1 g/kg/gün KCit ve içme suyunda litojen bulunan) grubu ve sildenafil sitrat + KCit kombine tedavi (SP; sırasıyla 1 mg/kg/gün sildenafil sitrat ve 1 g/kg/gün KCit + içme suyunda litojen) grubu olmak üzere 5 gruba randomize edildi. Litojen alan gruplarda içme sularında sürekli olarak EG %0,75 ve AC %1 verildi. Tedavi gruplarında ise KCit ve sildenafil sitrat tedavisi her gün bir defa orogastrik sonda ile verildi. 14 günlük tedaviyi takiben sıçanlar metabolik kafeslere alınarak 24 saatlik idrar toplandı. Ardından sıçanlar intraperitoneal xylazine (6 mg/kg) ve ketamin (75 mg/kg) anestezisi altında bilateral nefrektomiye takiben servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

Elde edilen 24 saatlik idrar, kalsiyum, oksalat ve direkt bakıda kristalüri açısından incelendi.

3.3. Histolojik Değerlendirme

Alınan nefrektomi materyallerinde histopatolojik değerlendirme için nefrektomiye takiben böbrek dokusu hiler aksından 2 eşit parçaya ayrılıp böbrek üst polü %10 fosfat tamponlu formalin solüsyonunda fikse edildi ve parafin bloklara gömüldü (Tablo 1). Bu parafin bloklardan Leica RM 2145 model mikrotomda hazırlanacak olan 5 mikronluk kesitler histopatolojik olarak değerlendirilmeye alındı (Tablo 2). Hematoksilen-Eozin boyamalarda (Tablo 3) mikroskopi incelemesi ve histopatolojik değerlendirme; “vasküler yapılarda

dilatasyon – konjesyon”, “tübüler vakoulizasyon”, “mononükleer hücre artışı” ve “tübüler nekroz” olarak 4 parametre belirlendi. Bu parametreler kullanılarak “1 (yok veya çok az)”, “2 (az)”, “3 (orta)”, “4 (şiddetli)” ve “5 (çok şiddetli)” şeklinde 0’dan 5’e kadar skor verildi.

Işık mikroskopisinde kristalizasyon, NOS ve TUNEL (Terminal deoxynükleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) metodu ile oksidatif stres ve apoptozis değerlendirildi. Kullanılan bir ışık mikroskobuna (Olympus BX-51) entegre renkli dijital kamera (Olympus C-5050) bulunan binoküler bir ışık mikroskobu görüntü analizi için kullanıldı. İmmunohistokimyasal (İHK) boyama ile elde edilen preparatlara büyük büyütme ile elde edilen görüntülerde pozitif reaksiyon veren hücreler sayıldı. 400 büyütmede her alanda immunpozitif hücre sayısı açısından “1 (0-5 hücre)”, “2 (5-10 hücre)”, “3(5-25)”, “4 (25-50)” ve “5 (50 ve üstü)” şeklinde 0’dan 5’e kadar skor verildi. Elde edilen veriler ortalama standart sapma olarak belirlenerek elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Tablo 1. Parafin Doku Takip Protokolü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
A.TESPİT	%10 FORMALİN	24-48SAAT
	AKARSU	24SAAT
B.DEHİDRATASYON	%60 ALKOL	½ SAAT
	%70ALKOL	½ SAAT
	%80 ALKOL	½ SAAT
	%95 ALKOL	½ SAAT
	%100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
	%100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
C.ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL:KSİLEN(1:1)	½ SAAT
	KSİLENI	1 SAAT
	KSİLENII	1 SAAT
D.İN FİLTRASYON	KSİLEN-PARAFİN(1:1)	½ SAAT
	PARAFİNİ	1 SAAT
	PARAFİNII	1SAAT
E. GÖMME	PARAFİN	

Tablo 2. Bouin Takip Protokolü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
A.TESPİT	BOUIN SOLÜSYONU	24-48SAAT
B.DEHİDRATASYON	%70 ALKOL	1 GECE
	%70 ALKOL	1 SAAT
	%70 ALKOL	1 SAAT
	%70 ALKOL	1 SAAT
	%80ALKOL	1 SAAT
	%100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
	%100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
C.ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL:KSİLEN(1:1)	2 SAAT
	KSİLEN	1GECE
	KSİLEN	1 SAAT
D.İNFİLTASYON	KSİLEN-PARAFİN(1:1)	1 SAAT
	PARAFİN	3 SAAT
	PARAFİN	1GECE
E. GÖMME	PARAFİN	

Tablo 3. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLENI	30DAKİKA
	KSİLENI	30DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2DAKİKA
	%80 ALKOL	2DAKİKA
	%70 ALKOL	2DAKİKA
	%60 ALKOL	2DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2SANİYE
YIKAMA	AKAR SU	5DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5DAKİKA
	%80 ALKOL	1DAKİKA
	%95 ALKOL	1DAKİKA
KURUTMA	HAVADA VEYA ETÜVDE	
	KSİLEN	1SAAT
KAPAMA	ENTELLAN	

3.4. Avidin-Biyotin Peroksidaz Yöntemi ile İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Aynı dokulardan yapılan ek kesitler indirekt İHK boyama için hazırlandı. Deparafinizasyon işlemi yapılan kesitler önce tripsinize edilip dakopen ile çevrelenerek, dokuda bulunan peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3'lük hidrojen peroksidaz uygulandı. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkanan kesitlere spesifik boyanma sağlamak için bloklama solüsyonu uygulandı. Kesitler yıkanmadan bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı. Primer antikoları 1:100 dilüsyonlarında kullanıldı, 18saat +4°C'de nemli ortamda inkübe edildi. Sekonder kit olarak avidin-biyotin-peroksidaz sistemi (Invitrogen®-Histostain Plus Bulk Kit, Invitrogen® 2ndGeneration LAB-SA Detection System, Catno:85-9043, Broadspectrum, Camarillo, CA) kullanıldı. PBS ile yıkanan kesitler biyotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz sekonder antikoru ile 30 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkanan kesitlere 30 dakika streptavidin uygulandı. İmmünoaktivitenin görünür hale gelebilmesi için DAB (Diaminobenzidine Kromojen, DAB Kit, Invitrogen®Cat. No: 00-2014) uygulanan kesitler, Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması yapılarak alkolden geçirilip, ksilen ile şeffaflaştırma yapılarak entellan ile kapatıldı (Tablo 4). İmmünoaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile birer kesit kontrol boyaması için ayrıldı ve antikor uygulanmadan boyama gerçekleştirildi. İmmünoaktivitenin şiddetine göre minimal veya yok "1", az "2", orta "3", şiddetli "4" ve çok şiddetli "5" olarak skorlandı.

Tablo 4. Avidin-Biyotin Peroksidaz Yöntemi İle İndirekt İHK Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLENI	30DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLENIİ	30DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2DAKİKA
	%80 ALKOL	2DAKİKA
	%70 ALKOL	2DAKİKA
	%60 ALKOL	2DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLESU	10DAKİKA
	PBS	10DAKİKA
HAVUZCUK OLUŞTURMA	DAKOPEN	
	TRİPSİN37°C etüvde	10DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOK	%3 HİDROJEN PEROKSİT	5DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5DAKİKA
BLOKLAMA	Non-immünbloklamasolüsyonu	1SAAT
PRİMER ANTİKORLAR	anti- mTORC1,anti- mTORC2, anti- IGF1, anti-PI3K, anti-pAKT1/2/3,anti-ERK1,anti-pERK1/2.	18SAAT (+4°Cnemli ortamda)
YIKAMA	PBS	3×5DAKİKA
SEKONDER ANTİKOR	BIYOTINLE İŞARETLİ SEKONDER	30DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5DAKİKA
BOYAMA	DAB (Diamino benzidine)	10DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3×5DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	
İNCELEME	OLYMPUSMARKAİŞİKMİKROSKOBU	

3.4.1. NOS İmmünohistokimyası

Deney sonunda yüksek doz anestezi ile öldürülen hayvanlara önce nötral formalinle kardiak perfüzyon uygulandı daha sonra dokular alınarak 48 saat %10 formalin ile fikse edildi. Alınan kesitler İHK boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solusyonu ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar (eNOS ile iNOS) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti hidrojen peroksidaz ikincil antikoru ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidin tetrahidroklorit ile 5 dakika boyandı. Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dakika yıkanan kesitler kapatma medyumunu ile kapatıldı.

3.4.2. TUNEL İmmünohistokimyası

TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde Dead End Colorimetric TUNEL system, Promega G7130 kiti kullanılarak 5 µm kalınlığındaki parafin bloklardan alınmış kesitlere uygulandı. Kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde ısı ile deparafinize edildi. Ardından 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinize edildi. Azalan alkol serileri ile 2'şer dakika (%95, %80, %70, %60) rehidratasyon uygulandıktan sonra dokulara serum fizyolojik ile oda ısısında 5 dakika (%0,85 NaCl) muamele edildi. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. Doku kesitleri %4 paraformaldehit ile 15 dakika oda ısısında fiske edildi. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/ml proteinase K 20 dakika doku kesitlerine uygulandı. PBS ile yıkamayı takiben %4'lük paraformaldehit ile 5 dakika yeniden fiksasyon yapıldı. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. Kesitler 5-10 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutuldu. TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37 °C de 60 dakika plastik cover slipler kesitleri kapatacak şekilde konarak tutuldu. 15 dakikalık SSC yıkamasının ardından 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 3-5 dakika hidrojen peroksit uygulanması sonrası 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı, 1/500 oranında PBS ile hazırlanan Streptavidin HRP solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübasyona tabi tutuldu. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı ve ardından diaminobenzidin ile boyama yapıldı, birkaç kere

distile su ile yıkama yapıldı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptanmaya çalışıldı. Negatif kontrol için primer antikor yerine PBS, pozitif kontrol olarak da apoptozis olduğu bilinen böbrek dokuları kullanıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirmede preparatlara boyanın yoğunluğu ve dağılımına göre + "1" ile +++++ "5" olarak körlemesine semi-kantitatif puanlama yapıldı.

3.5. Biyokimyasal Değerlendirme

Renal kalsiyum değerleri spektrometrik olarak otomatik analizörde (Merck, Washington, USA) mg/dl olarak ölçülürken idrar kalsiyum (mg/dl) ve oksalat miktarı (mg/gün) kitleri (Trinity Biotech plc, Wicklow, Ireland) ile spektrometre ile belirlendi. İdrar mikroskopik bakısında ışık mikroskopunda değişik boyut ve sayıda izlenen kristaller sayılarak yok veya her alanda 1 tane "1", her alanda 1-3 tane "2", her alanda 4-10 tane "3" olarak skorlandı (42).

Deneklerden MDA, SOD, NO analizi için alınan böbrek materyali alüminyum folyolara sarılarak azot tankı içine sarkıtıldı. Azot tankının içinde laboratuvara ulaştırılan doku örnekleri analiz gününe kadar -70°C'de donduruldu. İncelenen örneklerde SOD antioksidanı ile MDA ve NO oksidanların düzeylerine bakıldı. Deney sonunda sıçanların nefrektomi materyalinden alınan doku örnekleri tartılıp, 1/5 oranında soğuk %1,15 M KCl solüsyonu ile 14000 devirde 30 dakika homojenize edildi. Daha sonra + 4°C de 10000 x g de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı. Süpernatantlarda antioksidan enzim düzeyleri ve oksidatif hasarın göstergesi olan NO ve MDA ile SOD düzeyleri ölçüldü. SOD enzim aktivite sonuçları U/mg protein, MDA seviyesi nmol.mg protein, NO seviyesi ise µmol/mg protein olarak tayin edildi

SOD aktivitesi kalorimetrik olarak tetrazolium tuzlarının süperoksit radikallerinin ölçümünde kullanılması ve reaksiyonun 440 nm okuyucuda (Bio-tek EL 312, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, Amerika) okunması ile gerçekleştirildi. Bir ünite SOD miktarı radikallerin yarısını değiştiren enzim miktarı olarak değerlendirildi ve değerler U/mg protein olarak verildi. Doku MDA düzeyleri, homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat ile bağlanmasından sonra örnekte bulunan MDA'nın tiobarbitürik asit ile asidik pH ve sıcak ortamda tepkimesi sonucu oluşan pembe renkli pigmentin spektrofotometrik olarak 532 nm dalga boyunda absorbandsa (Bio-tek EL 312, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, Amerika) ölçümüne dayanmaktadır. NO ölçümü, nitrit düzeylerini tespit etmek için Griess metodu kullanılarak yapıldı (43).

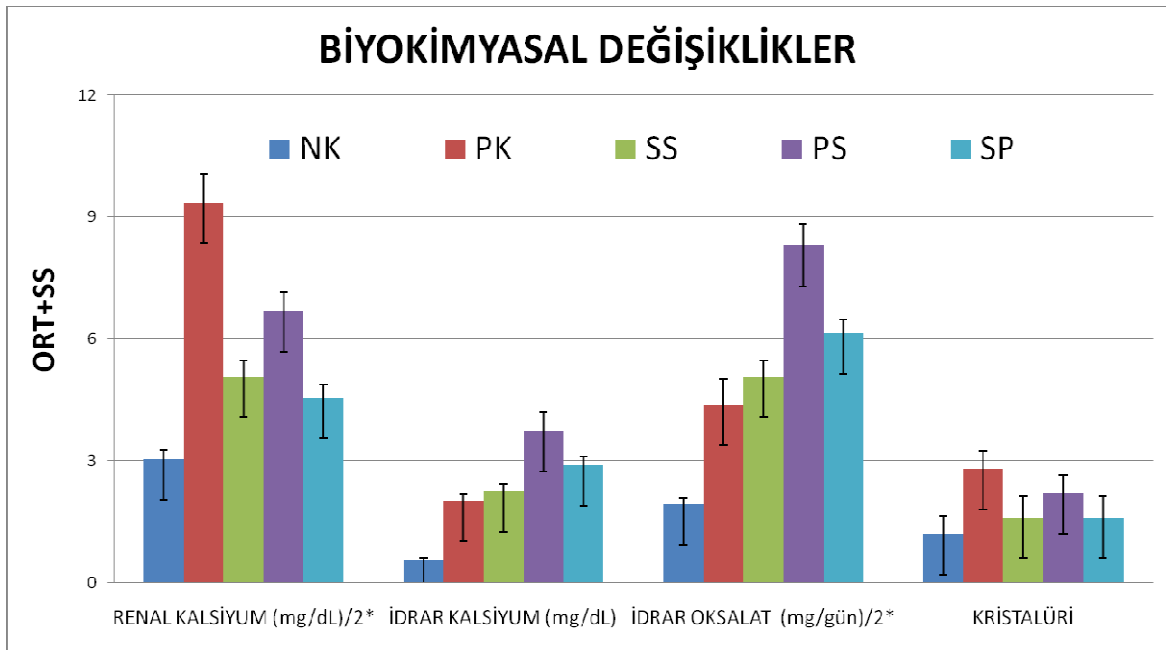
3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Grupların hepsinde parametrelerin ortalama değerleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile PRISM yazılımı (GraphPad 4.0, San Diego,USA) kullanılarak karşılaştırıldı. ANOVA testinin anlamlı olduğu durumlarda ikincil (post hoc) test olarak Tukey HSD testi kullanıldı. Tüm veriler ortalama değer \pm standart sapma (SD) şeklinde belirlendi, p değerleri 0,05'ten küçük çıktığı zaman anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

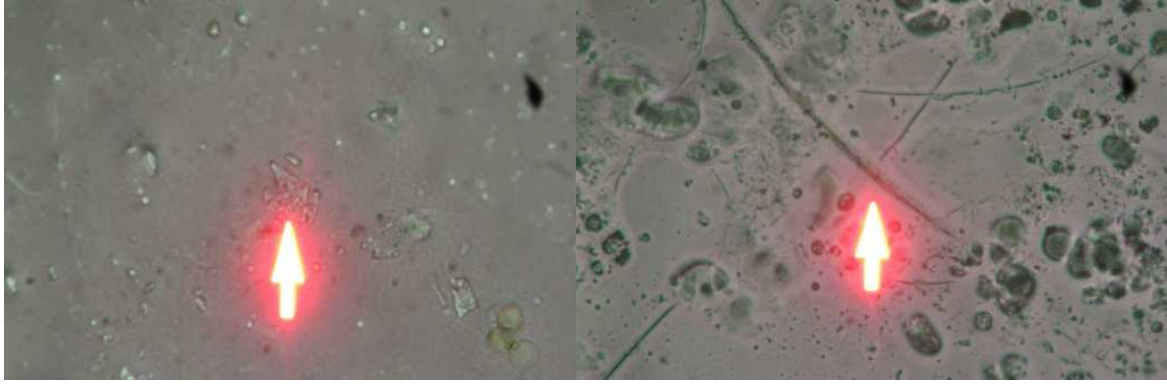
4.1. Biyokimyasal Bulgular

Taş modeli oluşturulan sıçanlarda renal kalsiyum, idrar kalsiyum ve idrar oksalat parametreleri için biyokimyasal incelemeler sonucunda NK örneklerinde oldukça az olan parametrelerin PK örneklerinde anlamlı bir şekilde arttığı izlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 1). PS grubunda, PK grubuna göre idrar oksalat ve kalsiyumunda anlamlı olarak artış görülmüştür ($p<0.001$). Tedavi grupları olan SS, PS ve SP'de, PK'e göre anlamlı olarak azalan renal kalsiyum değerleri izlenmektedir ($p<0.001$). SS ve SP gruplarında izlenen renal kalsiyum değerindeki azalmanın, PS grubuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir ($p<0.001$). Hiperoksalüri oluşturulan sıçanlarda biyokimyasal incelemeler sonucunda NK örneklerinde oldukça az olan kristalürinin PK örneklerinde anlamlı olarak artmış olduğu ($p<0.001$) görülmektedir. Tedavi grupları olan SS ve SP örneklerinde de PK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalan kristalüri saptanmıştır ($p<0.01$). Ancak PS grubunda PK ile kıyaslandığında izlenen kristalüride azalma anlamlı saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 2). Tedavi grupları olan SS, PS ve SP gruplarında saptanan kristalüri değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Değerlendirilen veriler ve istatistik sonuçları tablolarda özetlenmiştir (Tablo 5-8).



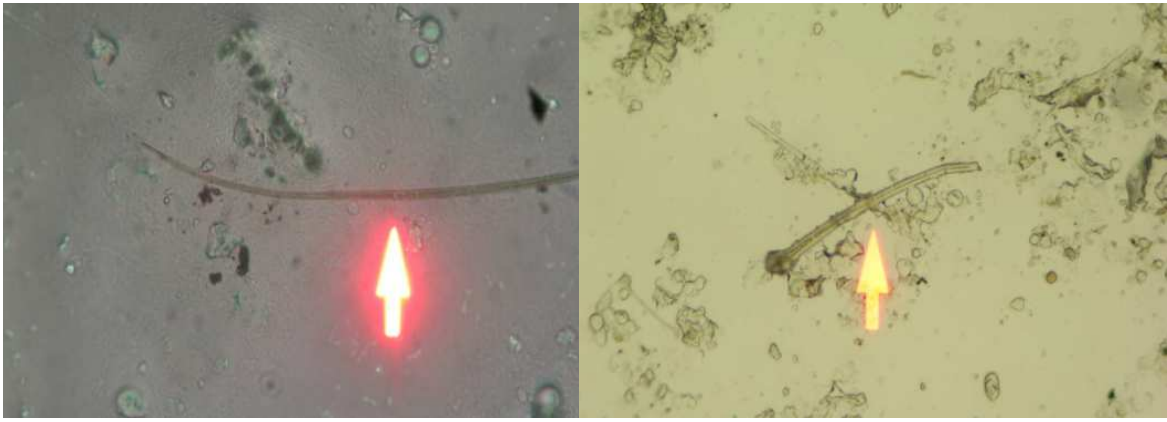
*PK grubundaki yüksek renal kalsiyum ve PS grubundaki yüksek idrar oksalat değerleri nedeniyle, şekil anlaşılabilirliğinin korunması için, tüm gruplarda renal kalsiyum ve idrar oksalat değerleri 2'ye bölünerek şekil oluşturulmuştur

Şekil 1. Grupların Renal Kalsiyum ve İdrar Parametreleri Açısından Karşılaştırılması



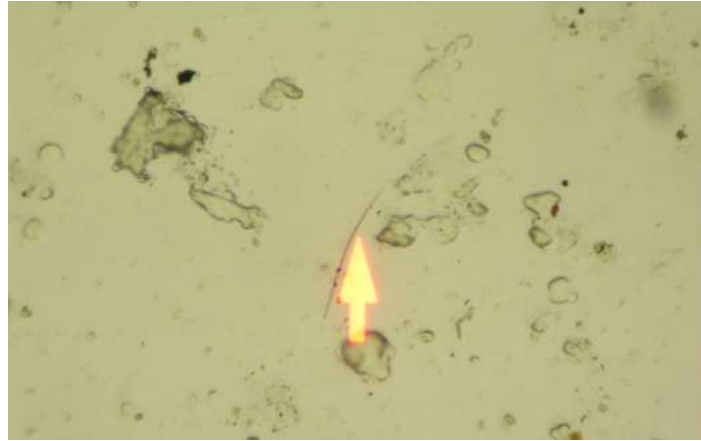
NK X4

PK x4



SS X4

PS x4



SPX4

Şekil 2. İdrar Direkt Bakısında Kristalürinin Değerlendirilmesi

Tablo 5. Renal Kalsiyum Değerleri ve İstatistik Sonuçları

Gruplar	Veri 1 (mg/dl)	Veri 2 (mg/dl)	p değeri
NK vs PK	6,1 ± 0,5	18,7 ± 1,4	P<0.001
NK vs SS	6,1 ± 0,5	10,2 ± 0,8	P<0.001
NK vs PS	6,1 ± 0,5	13,4 ± 1	P<0.001
NK vs SP	6,1 ± 0,5	9,1 ± 0,7	P<0.001
PK vs SS	18,7 ± 1,4	10,2 ± 0,8	P<0.001
PK vs PS	18,7 ± 1,4	13,4 ± 1	P<0.001
PK vs SP	18,7 ± 1,4	9,1 ± 0,7	P<0.001
SS vs PS	10,2 ± 0,8	13,4 ± 1	P<0.001
SS vs SP	10,2 ± 0,8	9,1 ± 0,7	P>0.05
PS vs SP	13,4 ± 1	9,1 ± 0,7	P<0.001

Tablo 6. İdrar Kalsiyum Değerleri ve İstatistik Sonuçları

Gruplar	Veri 1 (mg/dl)	Veri 2 (mg/dl)	p değeri
NK vs PK	0,6 ± 0,04	2 ± 0,2	P<0.001
NK vs SS	0,6 ± 0,04	2,9 ± 0,2	P<0.001
NK vs PS	0,6 ± 0,04	3,7 ± 0,3	P<0.001
NK vs SP	0,6 ± 0,04	2,2 ± 0,2	P<0.001
PK vs SS	2 ± 0,2	2,2 ± 0,2	P>0.05
PK vs PS	2 ± 0,2	3,7 ± 0,3	P<0.001
PK vs SP	2 ± 0,2	2,9 ± 0,2	P<0.001
SS vs PS	2,2 ± 0,2	3,7 ± 0,3	P<0.001
SS vs SP	2,2 ± 0,2	2,9 ± 0,2	P<0.001
PS vs SP	3,7 ± 0,3	2,9 ± 0,2	P<0.001

Tablo 7. İdrar Oksalat Değerleri ve İstatistik Sonuçları

Gruplar	Veri 1 (mg/gün)	Veri 2 (mg/gün)	p değeri
NK vs PK	3,9 ± 0,3	8,8 ± 0,7	P<0.001
NK vs SS	3,9 ± 0,3	10,2 ± 0,8	P<0.001
NK vs PS	3,9 ± 0,3	16,6 ± 1,3	P<0.001
NK vs SP	3,9 ± 0,3	12,3 ± 0,9	P<0.001
PK vs SS	8,8 ± 0,7	10,2 ± 0,8	P>0.05
PK vs PS	8,8 ± 0,7	16,6 ± 1,3	P<0.001
PK vs SP	8,8 ± 0,7	12,3 ± 0,9	P<0.001
SS vs PS	10,2 ± 0,8	16,6 ± 1,3	P<0.001
SS vs SP	10,2 ± 0,8	12,3 ± 0,9	P<0.01
PS vs SP	16,6 ± 1,3	12,3 ± 0,9	P<0.001

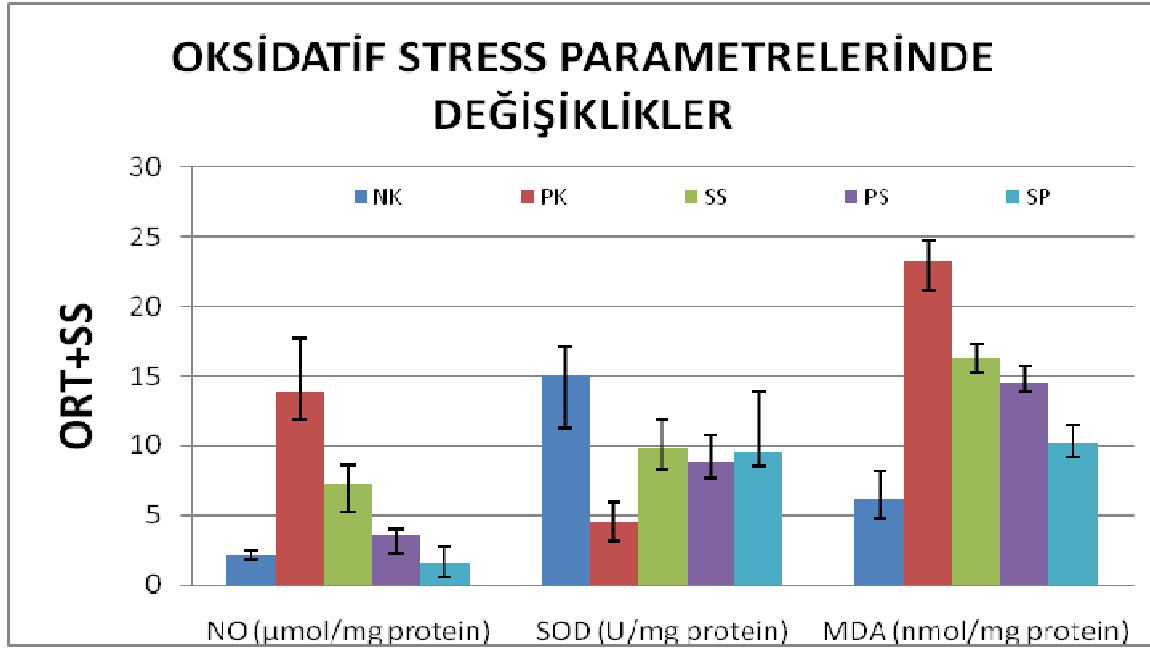
Tablo 8. Kristalüri Değerleri ve İstatistik Sonuçları

Gruplar	Veri 1*	Veri 2*	p değeri
NK vs PK	1,2 ± 0,4	2,8 ± 0,4	P<0.001
NK vs SS	1,2 ± 0,4	1,6 ± 0,5	P>0.05
NK vs PS	1,2 ± 0,4	2,2 ± 0,4	P<0.05
NK vs SP	1,2 ± 0,4	1,6 ± 0,5	P>0.05
PK vs SS	2,8 ± 0,4	1,6 ± 0,5	P<0.01
PK vs PS	2,8 ± 0,4	2,2 ± 0,4	P>0.05
PK vs SP	2,8 ± 0,4	1,6 ± 0,5	P<0.01
SS vs PS	1,6 ± 0,5	2,2 ± 0,4	P>0.05
SS vs SP	1,6 ± 0,5	1,6 ± 0,5	P>0.05
PS vs SP	2,2 ± 0,4	1,6 ± 0,5	P>0.05

*Veriler semi-kantitatif skorlama puanlarıdır.

4.2. Oksidatif Stres Bulguları

Morfolojik bulgularla ortaya konan litojene bağlı değişikliklerin oluşum mekanizmalarını incelemek amaçlı böbrek doku homojenatında oksidatif stres ve serbest radikal hasarı mekanizmalarının incelenmesi amaçlı yapılan oksidatif stres parametreleri olan NO ve MDA ölçümlerinde NK ile karşılaştırıldığında PK grubunda oldukça anlamlı ($p<0.001$) artış görülmüştür. NO ve MDA parametrelerinin PK ile karşılaştırıldığında tüm tedavi gruplarında yine oldukça anlamlı ($p<0.001$) bir şekilde azalmış olduğu bulunmuştur (Şekil 3). SOD düzeylerinin ise PK grubunda oldukça anlamlı olarak artmış olduğu ($p<0.001$) izlenirken, sadece sildenafil sitrat içeren tedavi grupları olan SS ve PS grubunda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p<0.05$). Değerlendirilen veriler ve istatistik sonuçları tablolarda özetlenmiştir (Tablo 9-11).



Şekil 3. Grupların Oksidatif Stres Parametreleri Açısından Karşılaştırılması

Tablo 9. NO Değerleri ve İstatistik Sonuçları

Gruplar	Veri 1 (µmol/mg protein)	Veri 2 (µmol/mg protein)	p değeri
NK vs PK	2,1 ± 0,3	13,9 ± 3,8	P<0.001
NK vs SS	2,1 ± 0,3	7,3 ± 1,3	P<0.01
NK vs PS	2,1 ± 0,3	3,6 ± 0,4	P>0.05
NK vs SP	2,1 ± 0,3	1,5 ± 0,2	P>0.05
PK vs SS	13,9 ± 3,8	7,3 ± 1,3	P<0.001
PK vs PS	13,9 ± 3,8	3,6 ± 0,4	P<0.001
PK vs SP	13,9 ± 3,8	1,5 ± 0,2	P<0.001
SS vs PS	7,3 ± 1,3	3,6 ± 0,4	P<0.05
SS vs SP	7,3 ± 1,3	1,5 ± 0,2	P<0.001
PS vs SP	3,6 ± 0,4	1,5 ± 0,2	P>0.05

Tablo 10. SOD Değerleri ve İstatistik Sonuçları

Gruplar	Veri 1 (U/mg protein)	Veri 2 (U/mg protein)	p değeri
NK vs PK	13 ± 1,2	6,5 ± 1,4	P<0.001
NK vs SS	13 ± 1,2	9,8 ± 2,1	P<0.05
NK vs PS	13 ± 1,2	8,8 ± 1,9	P<0.01
NK vs SP	13 ± 1,2	9,5 ± 4,5	P<0.05
PK vs SS	6,5 ± 1,4	9,8 ± 2,1	P<0.05
PK vs PS	6,5 ± 1,4	8,8 ± 1,9	P>0.05
PK vs SP	6,5 ± 1,4	9,5 ± 4,5	P<0.05
SS vs PS	9,8 ± 2,1	8,8 ± 1,9	P>0.05
SS vs SP	9,8 ± 2,1	9,5 ± 4,5	P>0.05
PS vs SP	8,8 ± 1,9	9,5 ± 4,5	P>0.05

Tablo 11. MDA Değerleri ve İstatistik Sonuçları

Gruplar	Veri 1 (nmol/mg protein)	Veri 2 (nmol/mg protein)	p değeri
NK vs PK	6,1 ± 2	23,2 ± 1,5	P<0.001
NK vs SS	6,1 ± 2	16,3 ± 1,1	P<0.001
NK vs PS	6,1 ± 2	14,5 ± 1,3	P<0.001
NK vs SP	6,1 ± 2	10,2 ± 1,2	P<0.01
PK vs SS	23,2 ± 1,5	16,3 ± 1,1	P<0.001
PK vs PS	23,2 ± 1,5	14,5 ± 1,3	P<0.001
PK vs SP	23,2 ± 1,5	10,2 ± 1,2	P<0.001
SS vs PS	16,3 ± 1,1	14,5 ± 1,3	P>0.05
SS vs SP	16,3 ± 1,1	10,2 ± 1,2	P<0.001
PS vs SP	14,5 ± 1,3	10,2 ± 1,2	P<0.01

4.3. Histolojik Bulgular

Taş modeli oluşturulan sıçanlarda çıkarılan böbreklerin makroskobik görüntülerinde korteks ve medullada NK ile karşılaştırıldığında PK grubunda litojen uygulamasına bağlı morfolojik değişikliklerin olduğu ($p<0.001$) (Şekil 4) ve bu değişikliklerin özellikle sildenafil sitrat içeren tedavi gruplarında pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı izlendi ($p<0.001$). Değerlendirilen veriler ve istatistik sonuçları tablolarda özetlenmiştir (Tablo 12,13).



NK x4



PK x4



SS x4



PS x4



SP x4

Şekil 4. Grupların Böbrek Makroskopik Görüntüleri

Tablo 12. Korteks Makroskobisi Verileri ve İstatistik Sonuçları

Grup	Veri 1*	Veri 2*	p değeri
NK vs PK	1,2 ± 0,4	3,4 ± 0,5	P<0.001
NK vs SS	1,2 ± 0,4	2,6 ± 0,5	P<0.01
NK vs PS	1,2 ± 0,4	2,8 ± 0,4	P<0.001
NK vs SP	1,2 ± 0,4	1,8 ± 0,4	P>0.05
PK vs SS	3,4 ± 0,5	2,6 ± 0,5	P>0.05
PK vs PS	3,4 ± 0,5	2,8 ± 0,4	P>0.05
PK vs SP	3,4 ± 0,5	1,8 ± 0,4	P<0.001
SS vs PS	2,6 ± 0,5	2,8 ± 0,4	P>0.05
SS vs SP	2,6 ± 0,5	1,8 ± 0,4	P>0.05
PS vs SP	2,8 ± 0,4	1,8 ± 0,4	P<0.05

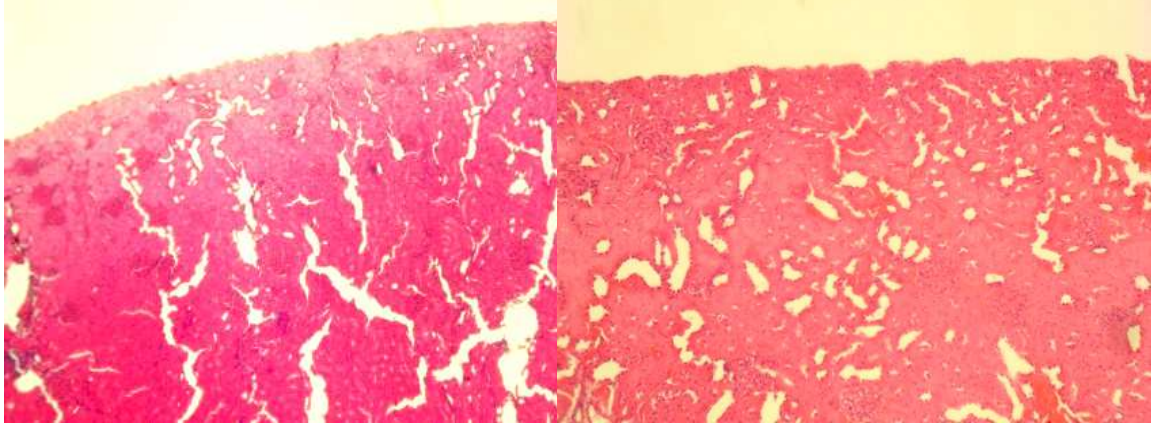
*Veriler semi-kantitatif skorlama puanlarıdır.

Tablo 13. Medulla Makroskobisi Verileri ve İstatistik Sonuçları

Grup	Veri 1*	Veri 2*	p değeri
NK vs PK	1,4 ± 0,5	4,4 ± 0,5	P<0.001
NK vs SS	1,4 ± 0,5	2,8 ± 0,8	P<0.05
NK vs PS	1,4 ± 0,5	3,2 ± 0,8	P<0.01
NK vs SP	1,4 ± 0,5	2,2 ± 0,4	P>0.05
PK vs SS	4,4 ± 0,5	2,8 ± 0,8	P<0.05
PK vs PS	4,4 ± 0,5	3,2 ± 0,8	P>0.05
PK vs SP	4,4 ± 0,5	2,2 ± 0,4	P<0.001
SS vs PS	2,8 ± 0,8	3,2 ± 0,8	P>0.05
SS vs SP	2,8 ± 0,8	2,2 ± 0,4	P>0.05
PS vs SP	3,2 ± 0,8	2,2 ± 0,4	P>0.05

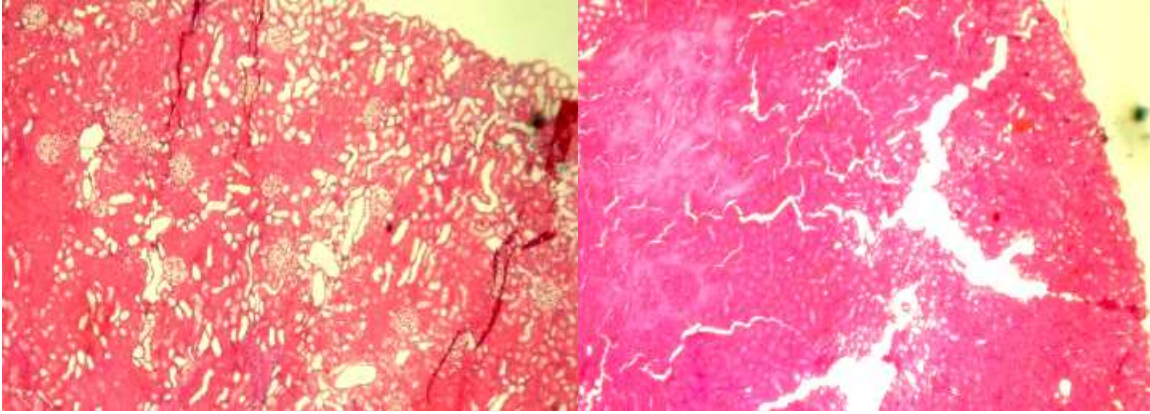
*Veriler semi-kantitatif skorlama puanlarıdır.

Makroskobik görüntülerde izlenen litojene bağlı değişikliklerin, örneklerin küçük büyütmede gerçekleştirilen histolojik incelemelerinde de hem korteks (Şekil 5) hem de medulla (Şekil 6) için var olduğu saptandı (p<0.001). PK grubunda belirgin olan bu değişikliklerin özellikle SP grubunda anlamlı olarak azaldığı izlendi (korteks: p<0.05, medulla: p<0.01).



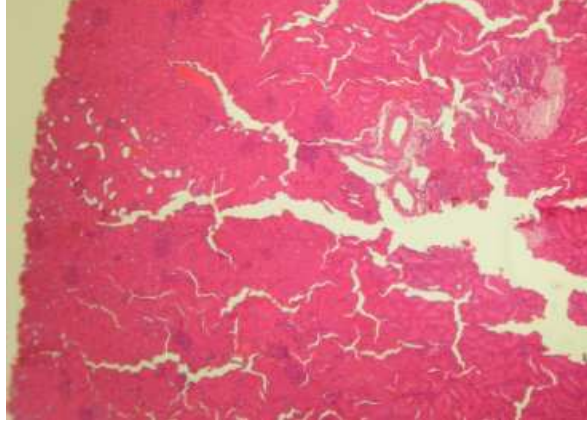
NK X40 korteks

PK x40 korteks



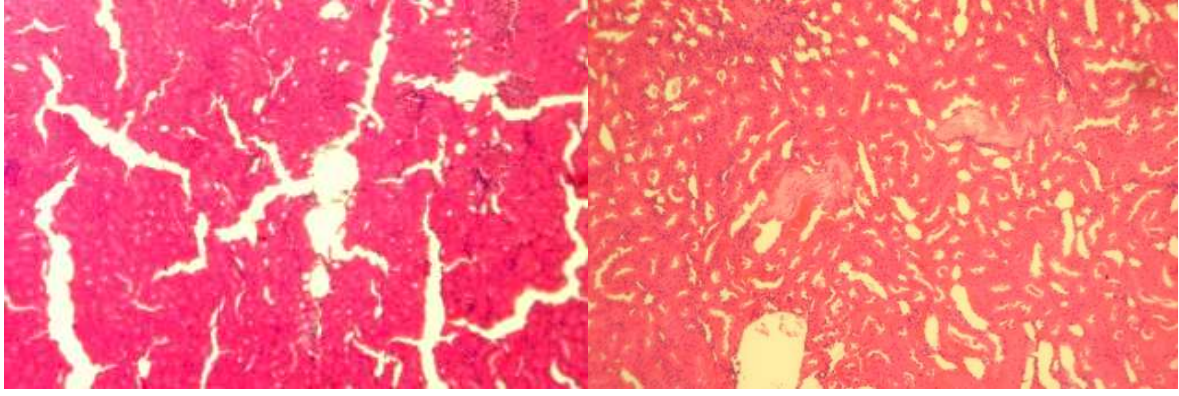
SS X40 korteks

PS x40 korteks



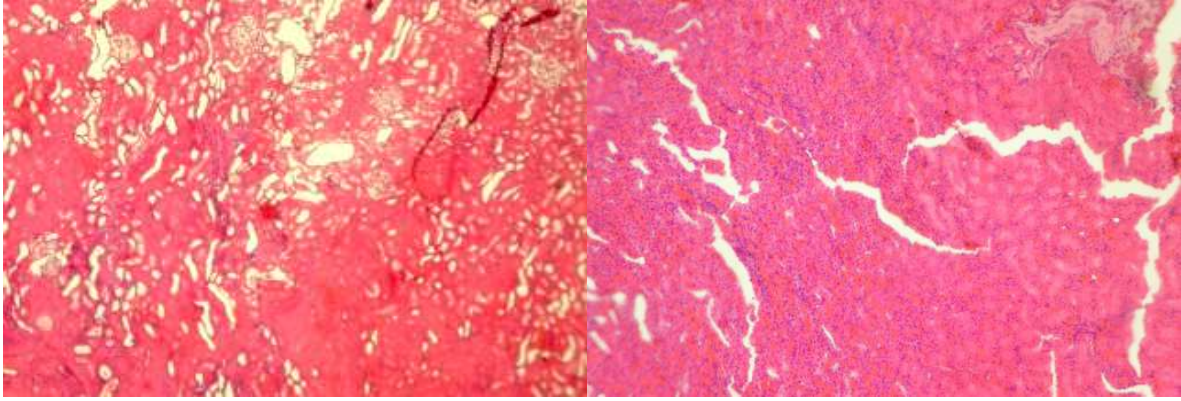
SP X40 korteks

Şekil 5. Renal Korteks Küçük Büyütme Mikroskopi Görüntüleri



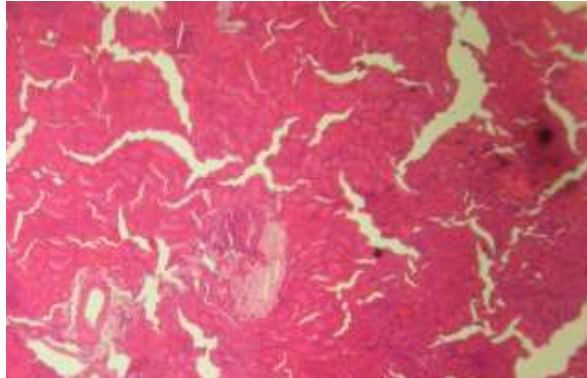
NK X40 medulla

PK x40 medulla



SS X40 medulla

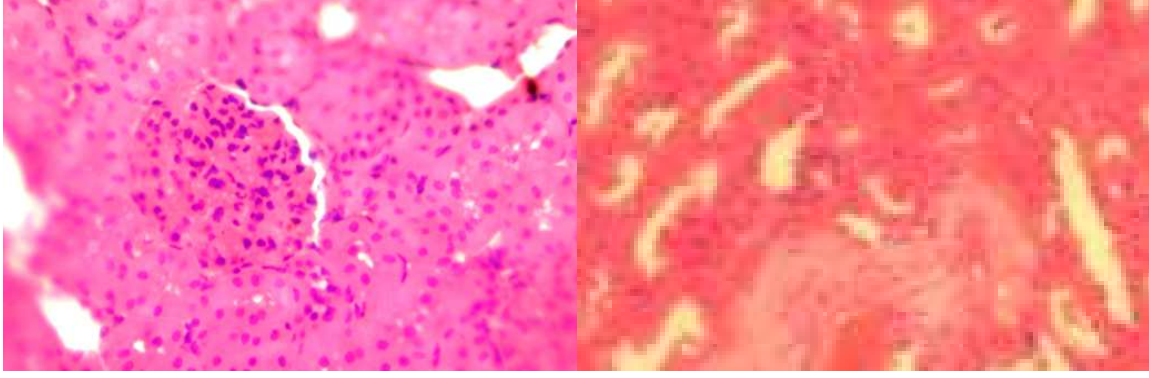
PS x40 medulla



SP X40 medulla

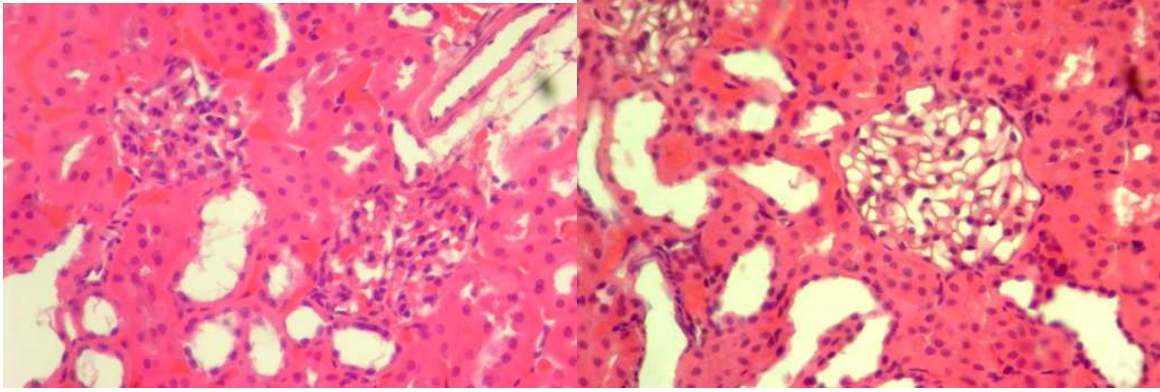
Şekil 6. Renal Medulla Küçük Büyütme Mikroskopi Görüntüleri

Mikroskobik bulgular büyük büyütmede incelendiğinde kortekste glomerüllerde az miktarda yapısal bozulmalar ve fibrotik odaklar şeklinde gözlemlendi (Şekil 7). Medullada tubüllerde ayrışma, çekirdeklerde kondensasyon, çekirdeklerin bazale doğru yer değiştirmesi ve fibrotik alanlar oluşması şeklinde izlendi (Şekil 8). Örneklerin x400 büyütme değerlendirmesinde de aynı değişiklikler izlenmektedir (Şekil 9,10). Mikroskobide değerlendirilen veriler ve istatistik sonuçları tablolarda özetlenmiştir (Tablo 14,15).



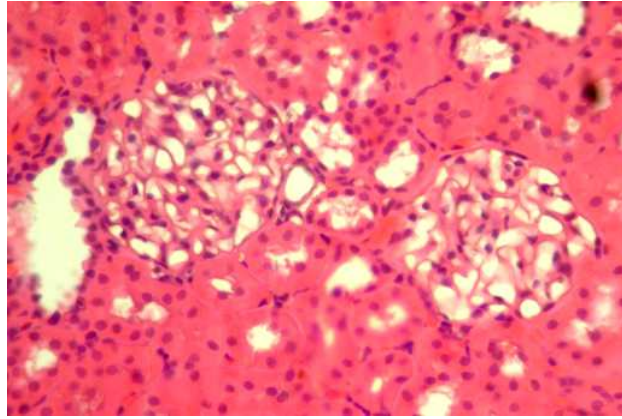
NK X100 korteks

PK X100 korteks



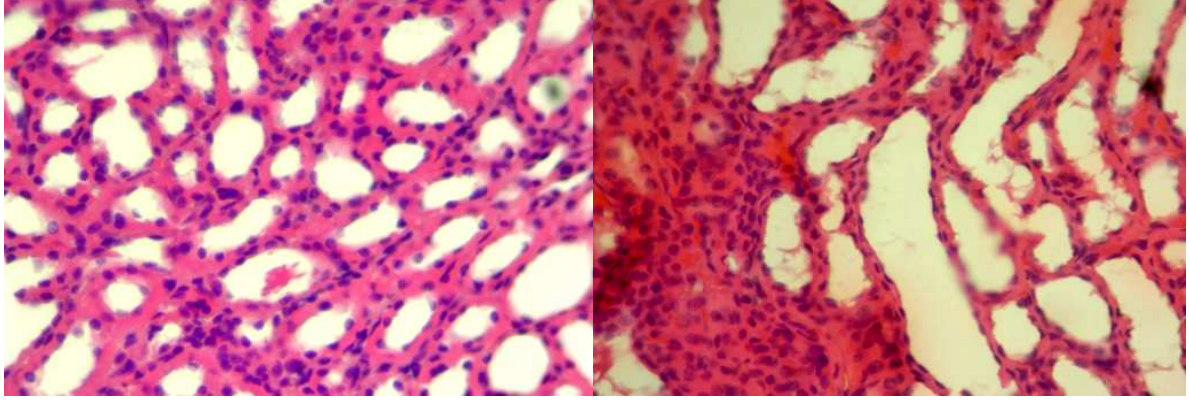
SS X100 korteks

PS X100 korteks



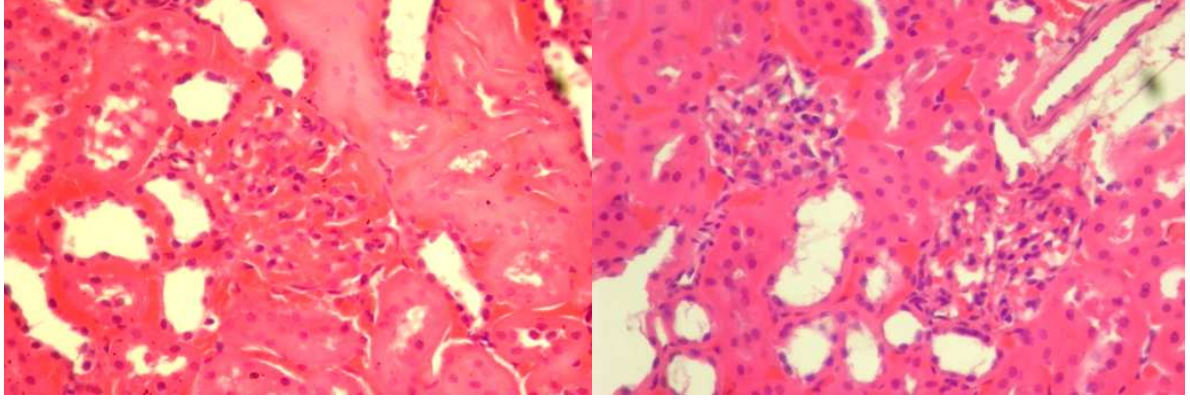
SP X100 korteks

Şekil 7. Renal Korteks Büyük Büyütme Mikroskopi Görüntüleri



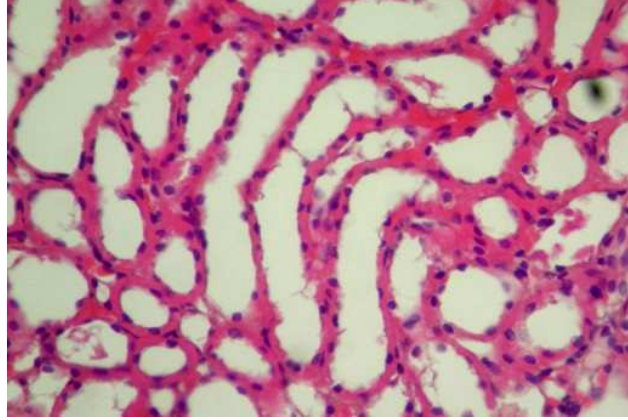
NK X100 medulla

PK X100 medulla



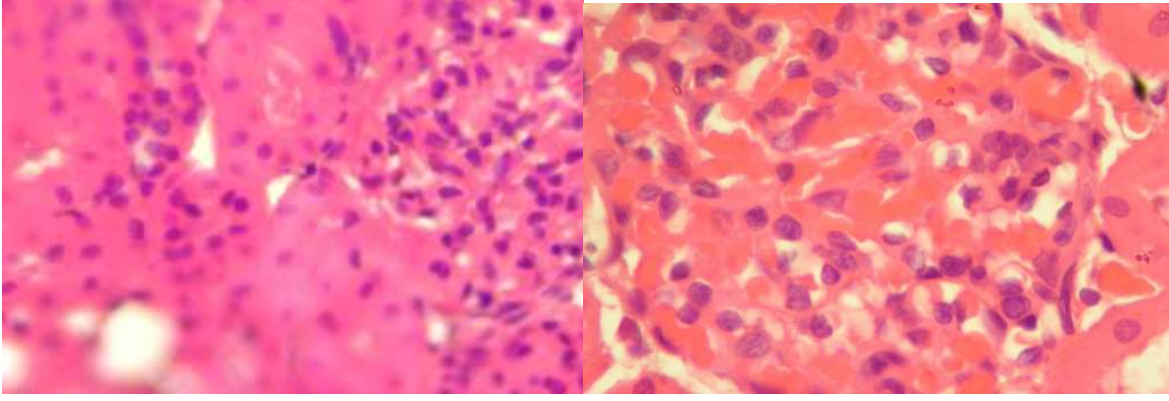
SS X100 medulla

PS X100 medulla



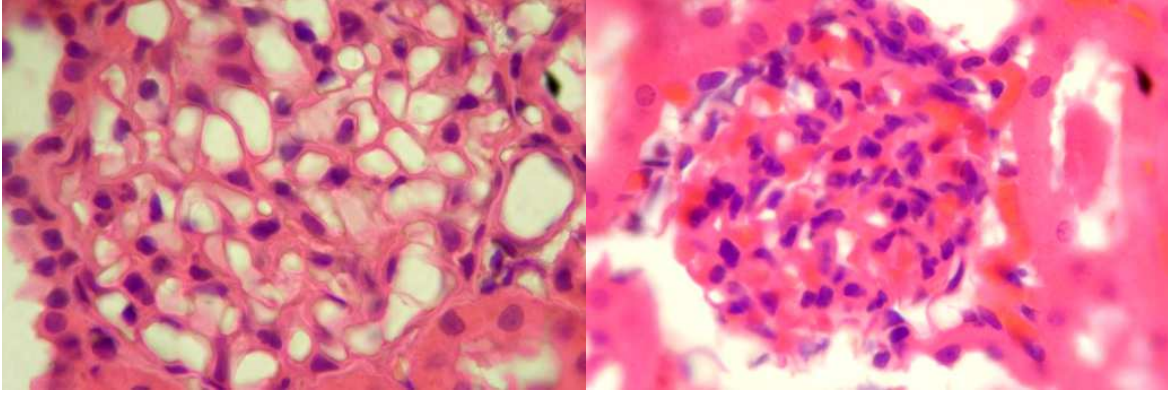
SP X100 medulla

Şekil 8. Renal Medulla Büyük Büyütme Mikroskopi Görüntüleri



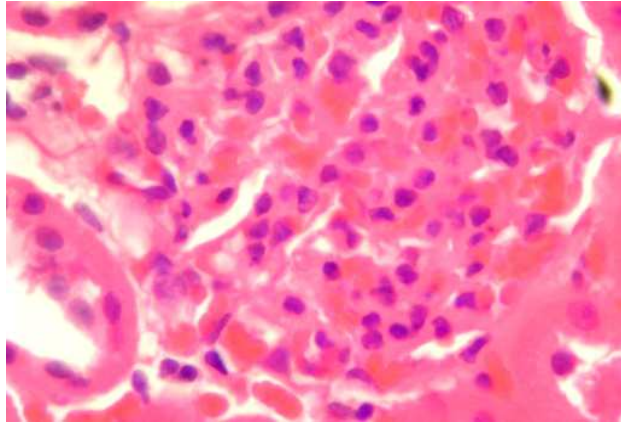
NK X400 korteks

PK X400 korteks



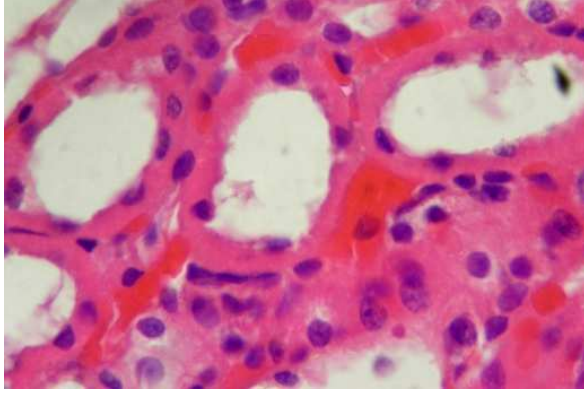
SS X400 korteks

PS X400 korteks

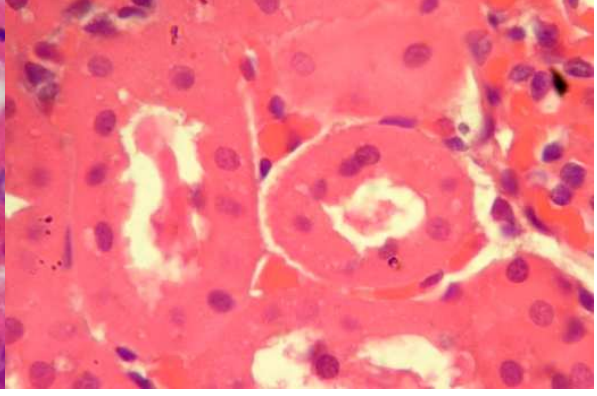


SP X400 korteks

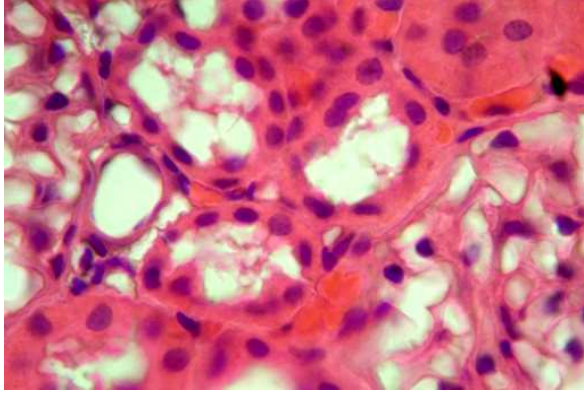
Şekil 9. Renal Korteks x400 Büyütme Mikroskopi Görüntüleri



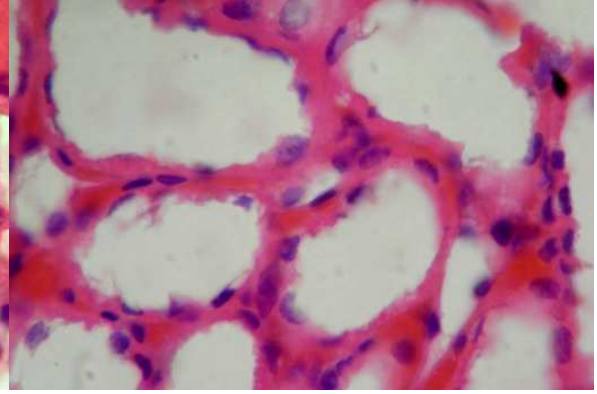
NK X400 medulla



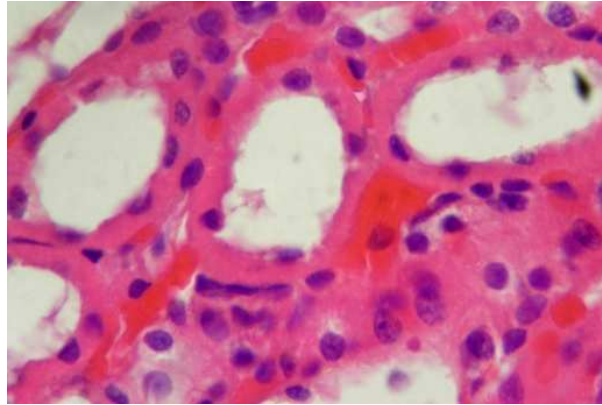
PK X400 medulla



SS X400 medulla



PS X400 medulla



SP X400 medulla

Şekil 10. Renal Medulla x400 Büyütme Mikroskopi Görüntüleri

Tablo 14. Korteks Mikroskobisi Verileri ve İstatistik Sonuçları

Grup	Veri 1*	Veri 2*	p değeri
NK vs PK	1,6 ± 0,5	4,4 ± 0,5	P<0.001
NK vs SS	1,6 ± 0,5	3,2 ± 1,1	P<0.05
NK vs PS	1,6 ± 0,5	3,4 ± 1,1	P<0.01
NK vs SP	1,6 ± 0,5	2,2 ± 0,4	P>0.05
PK vs SS	4,4 ± 0,5	3,2 ± 1,1	P>0.05
PK vs PS	4,4 ± 0,5	3,4 ± 1,1	P>0.05
PK vs SP	4,4 ± 0,5	2,2 ± 0,4	P<0.05
SS vs PS	3,2 ± 1,1	3,4 ± 1,1	P>0.05
SS vs SP	3,2 ± 1,1	2,2 ± 0,4	P>0.05
PS vs SP	3,4 ± 1,1	2,2 ± 0,4	P>0.05

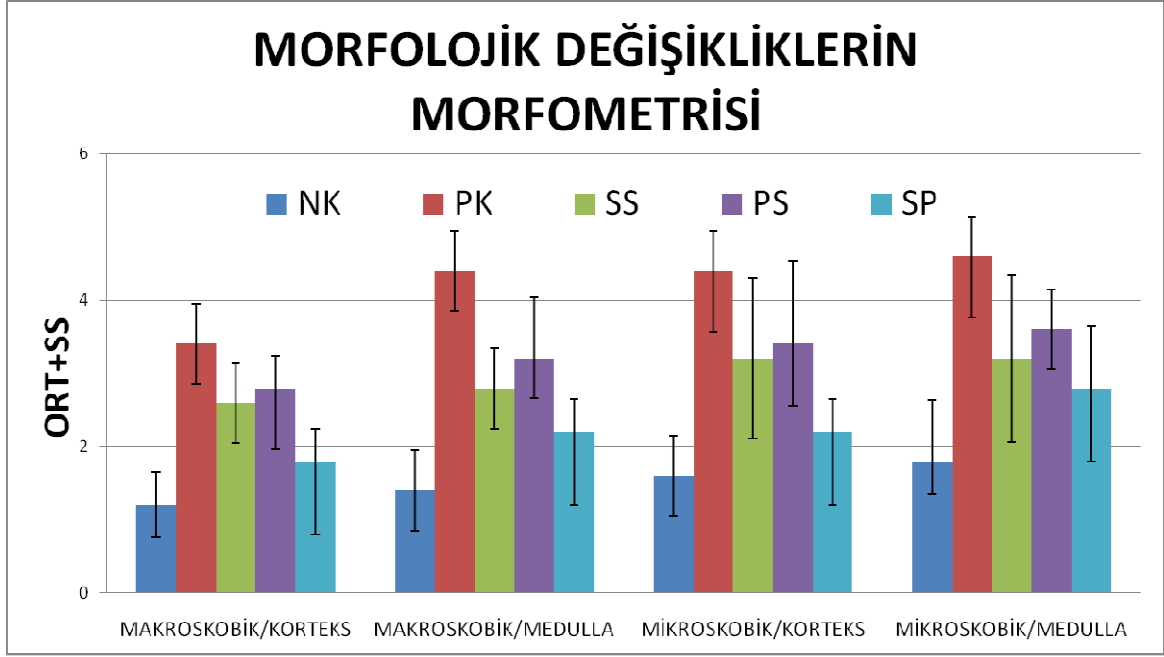
*Veriler semi-kantitatif skorlama puanlarıdır.

Tablo 15. Medulla Mikroskobisi Verileri ve İstatistik Sonuçları

Grup	Veri 1*	Veri 2*	p değeri
NK vs PK	1,8 ± 0,8	4,6 ± 0,5	P<0.001
NK vs SS	1,8 ± 0,8	3,2 ± 0,8	P<0.05
NK vs PS	1,8 ± 0,8	3,6 ± 0,5	P<0.01
NK vs SP	1,8 ± 0,8	2,8 ± 0,8	P>0.05
PK vs SS	4,6 ± 0,5	3,2 ± 0,8	P<0.05
PK vs PS	4,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5	P>0.05
PK vs SP	4,6 ± 0,5	2,8 ± 0,8	P<0.01
SS vs PS	3,2 ± 0,8	3,6 ± 0,5	P>0.05
SS vs SP	3,2 ± 0,8	2,8 ± 0,8	P>0.05
PS vs SP	3,6 ± 0,5	2,8 ± 0,8	P>0.05

*Veriler semi-kantitatif skorlama puanlarıdır.

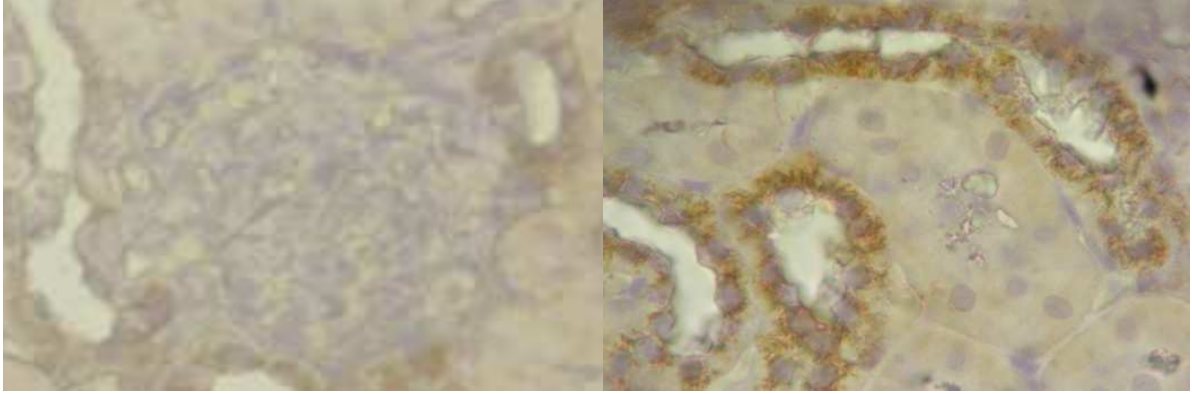
Histolojik bulguların morfometrik analizlerinde litojenle oluşan değişikliklerin PK örneklerinde anlamlı bir şekilde ($p<0.001$) arttığı görüldü. Kombine tedavi ile PK grubu arasında mikroskobik değerlendirmede izlenen anlamlı fark, benzer şekilde SS grubunda medulla mikroskobisinde de izlenmektedir ($p<0.05$). Tedavi grupları arasında korteks ve medulla mikroskobileri açısından gerçekleştirilen istatistiksel analizde farklılık gözlenmedi ($p>0.05$) (Şekil 11).



Şekil 11. Grupların Morfometrileri Açısından Karşılaştırılması

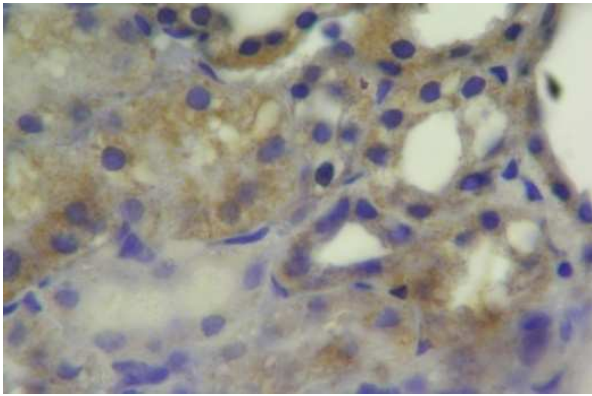
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Morfolojik bulgularla ortaya konan litojene bağlı değişikliklerin hem oluşum mekanizmalarını incelemek amaçlı hem de böbrek dokusunda oksidatif stres ve serbest radikal hasarı mekanizmalarının incelenmesi amaçlı NOS boyamaları yapıldı. eNOS (Şekil 12) ve iNOS (Şekil 13) boyamalarında endotel ve tübül epitellerinde belirgin olmak üzere pozitif immün reaktivitenin var olduğu ayrıca parankimde de boyanmanın var olduğu saptandı. NOS boyamalarında saptanan reaktivite PK grubunda NK grubuna göre anlamlı artış göstermektedir (iNOS: $p < 0.001$, eNOS: $p < 0.01$). Tedavi gruplarında iNOS açısından özellikle kombine tedavi grubunda PK grubu ile anlamlı farklılık göze çarpmaktadır (SS ve PS: $p < 0.05$, SP: $p < 0.001$). eNOS açısından sadece kombine tedavi grubunda, taş grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azalma saptanmıştır ($p < 0.01$). Değerlendirilen veriler ve istatistik sonuçları tablolarda özetlenmiştir (Tablo).

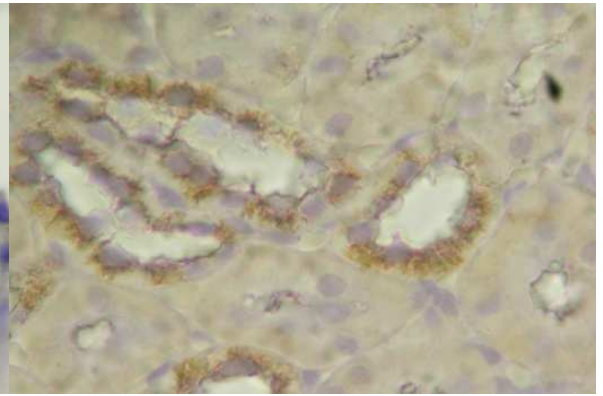


NK X400

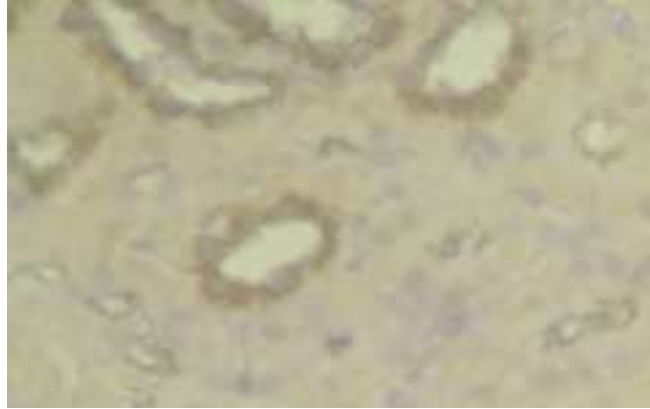
PK X400



SS X400

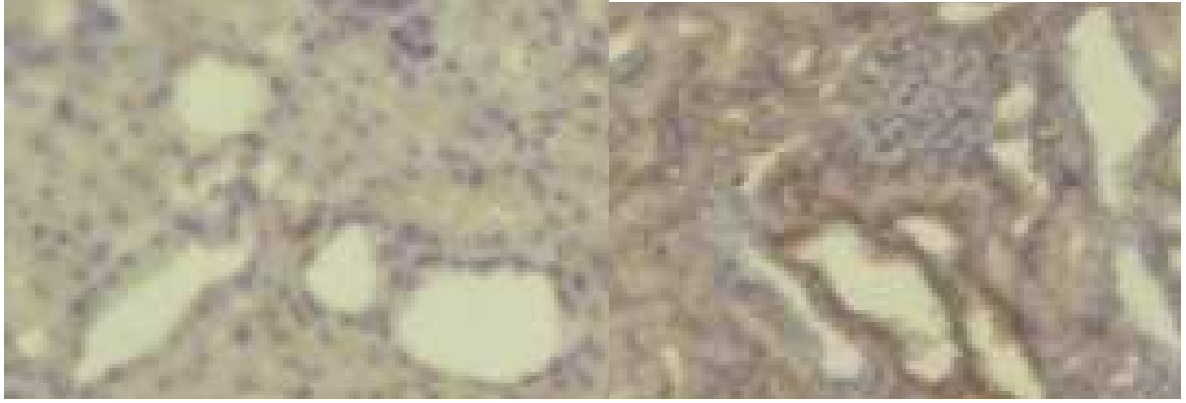


PS X400



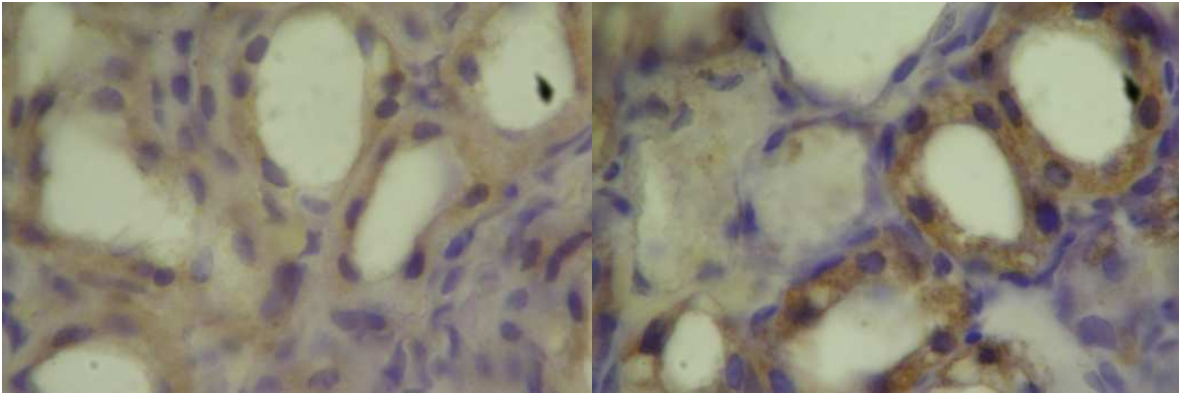
SP X400

Şekil 12. eNOS İHK Boyama Mikroskopik Görüntüleri



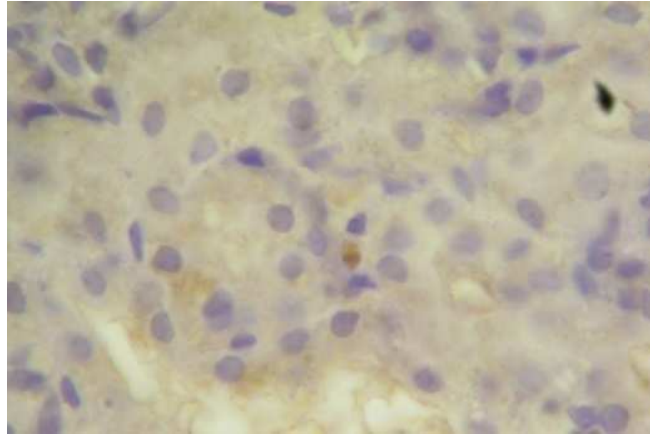
NK X400

PK X400



SS X400

PS X400



SP X400

Şekil 13. iNOS İHK Boyama Mikroskopik Görüntüleri

Tablo 16. iNOS İHK Verileri ve İstatistik Sonuçları

Gruplar	Veri 1*	Veri 2*	p değeri
NK vs PK	2,2 ± 0,4	4,4 ± 0,5	P<0.001
NK vs SS	2,2 ± 0,4	3,0 ± 0,7	P>0.05
NK vs PS	2,2 ± 0,4	3,0 ± 0,7	P>0.05
NK vs SP	2,2 ± 0,4	2,4 ± 0,5	P>0.05
PK vs SS	4,4 ± 0,5	3,0 ± 0,7	P<0.05
PK vs PS	4,4 ± 0,5	3,0 ± 0,7	P<0.05
PK vs SP	4,4 ± 0,5	2,4 ± 0,5	P<0.001
SS vs PS	3,0 ± 0,7	3,0 ± 0,7	P>0.05
SS vs SP	3,0 ± 0,7	2,4 ± 0,5	P>0.05
PS vs SP	3,0 ± 0,7	2,4 ± 0,5	P>0.05

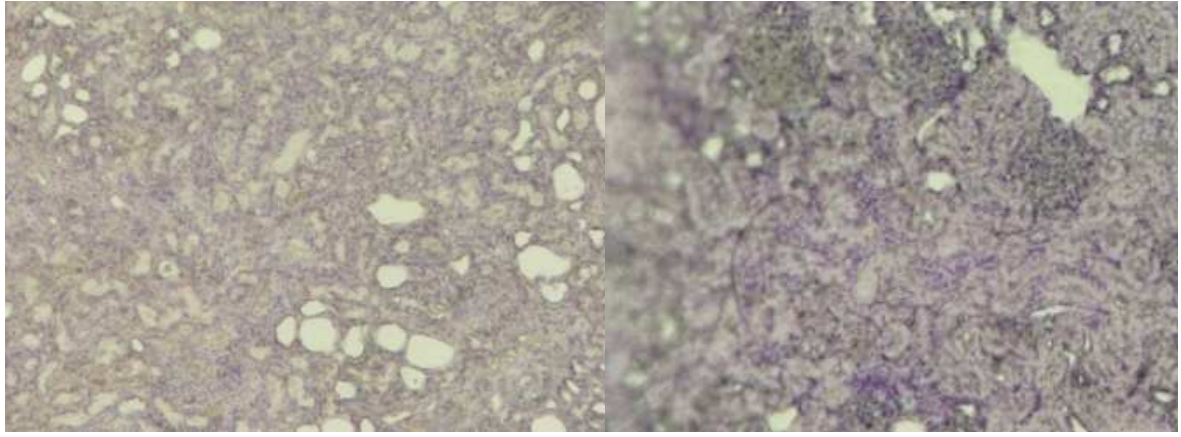
*Veriler semi-kantitatif skorlama puanlarıdır.

Tablo 17. eNOS İHK Verileri ve İstatistik Sonuçları

Gruplar	Veri 1*	Veri 2*	p değeri
NK vs PK	2,0 ± 0,7	3,6 ± 0,5	P<0.01
NK vs SS	2,0 ± 0,7	2,6 ± 0,9	P>0.05
NK vs PS	2,0 ± 0,7	3,2 ± 0,4	P<0.05
NK vs SP	2,0 ± 0,7	1,8 ± 0,4	P>0.05
PK vs SS	3,6 ± 0,5	2,6 ± 0,9	P>0.05
PK vs PS	3,6 ± 0,5	3,2 ± 0,4	P>0.05
PK vs SP	3,6 ± 0,5	1,8 ± 0,4	P<0.01
SS vs PS	2,6 ± 0,9	3,2 ± 0,4	P>0.05
SS vs SP	2,6 ± 0,9	1,8 ± 0,4	P>0.05
PS vs SP	3,2 ± 0,4	1,8 ± 0,4	P<0.05

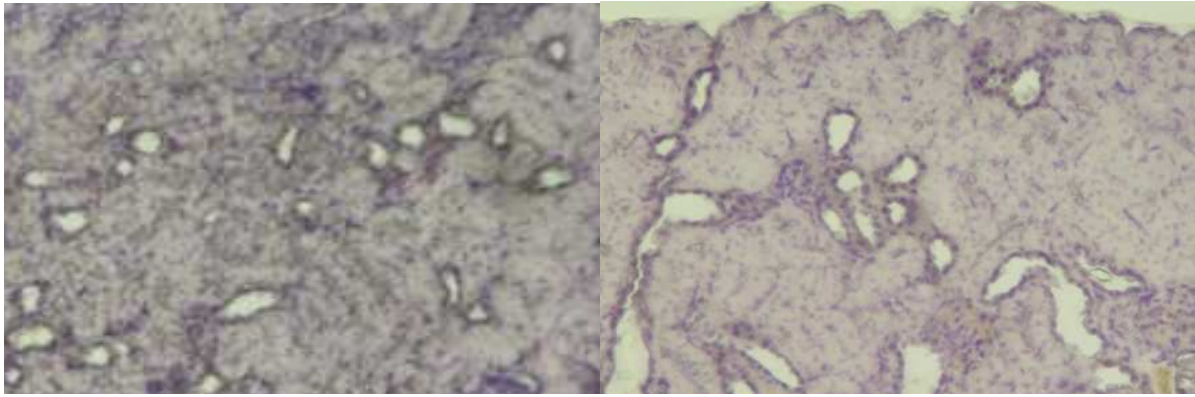
*Veriler semi-kantitatif skorlama puanlarıdır.

Litojen uygulamanın böbrek dokusunda neden olduğu oksidatif stresin hücrelerin ölümüne neden olması ve mikroskobide nekrotik odaklar olmamasından dolayı bu ölümün apoptoz üzerinden gerçekleşmesini değerlendirmek üzere yapılan TUNEL İHK (Şekil 14-16) incelemelerinde çok az miktarda hücrenin nekroza uğradığı izlendi. H-E boyamalarda kondense olmuş çekirdeklerle ortaya çıkan histolojik bulguların desteklediği apoptozis mekanizmasının litojen verilmesi ile anlamlı olarak arttığı izlendi (p<0.001). Değerlendirilen veriler ve istatistik sonuçları tabloda özetlenmiştir (Tablo 18).



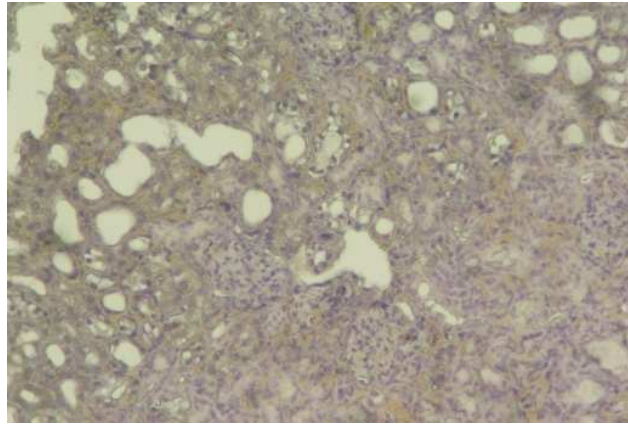
NK X100

PK X100



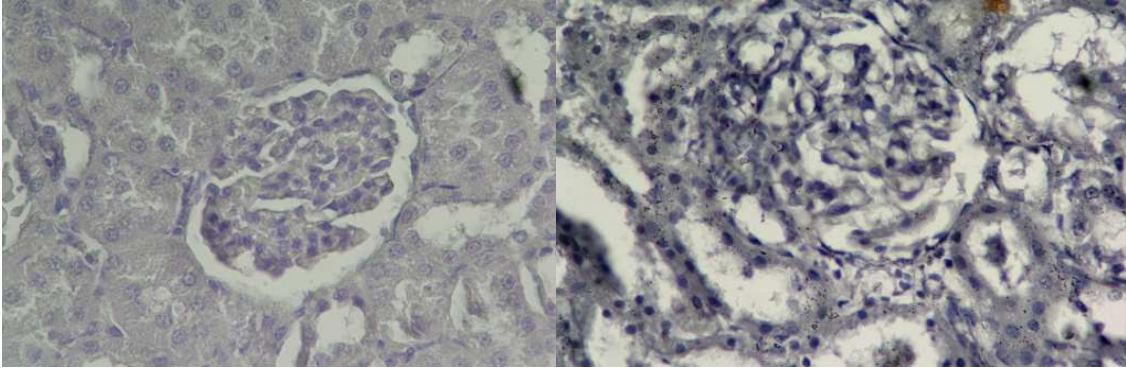
SS X100

PS X100



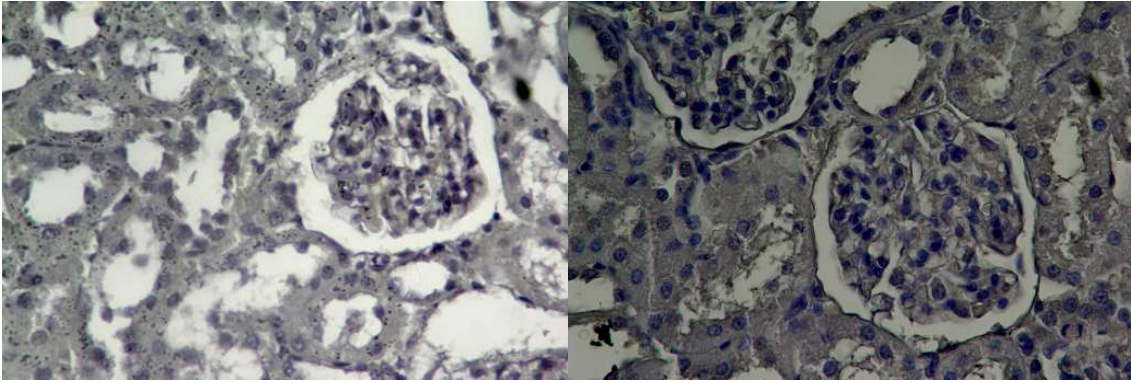
SP X100

Şekil 14. TUNEL İHK Boyama Küçük Büyütme Mikroskopik Görüntüleri



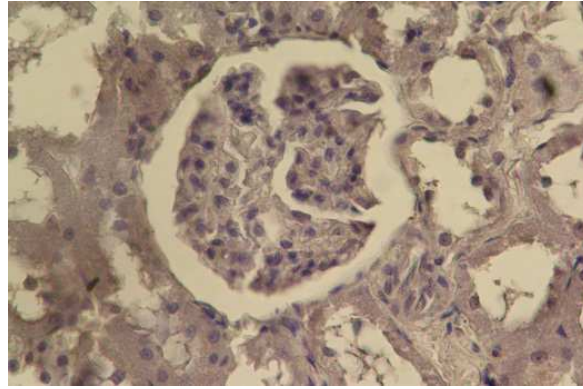
NK X400

PK X400



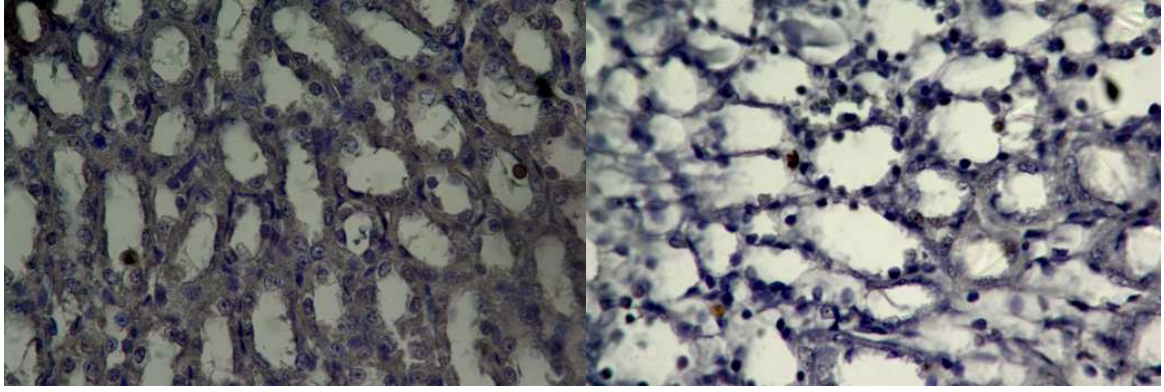
SS X400

PS X400



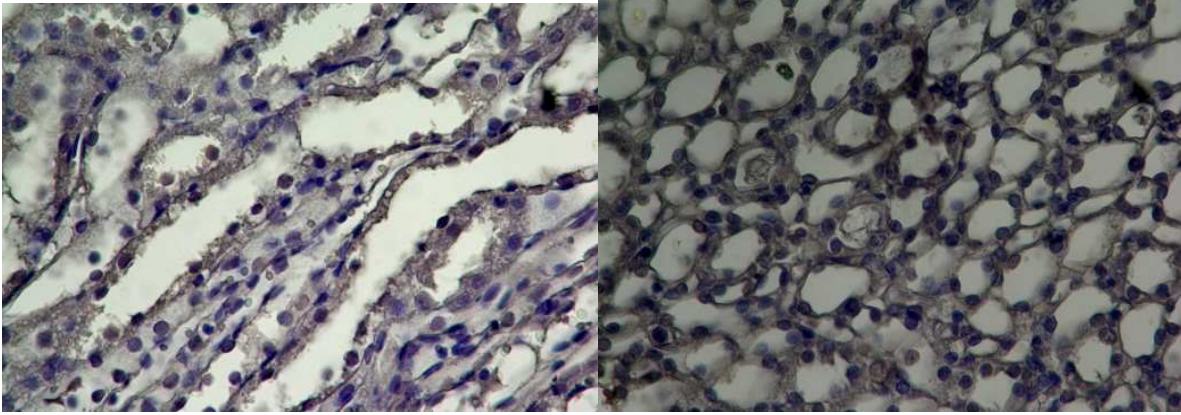
SP X400

Şekil 15. TUNEL İHK Boyama Büyük Büyütme Korteks Mikroskopik Görüntüleri



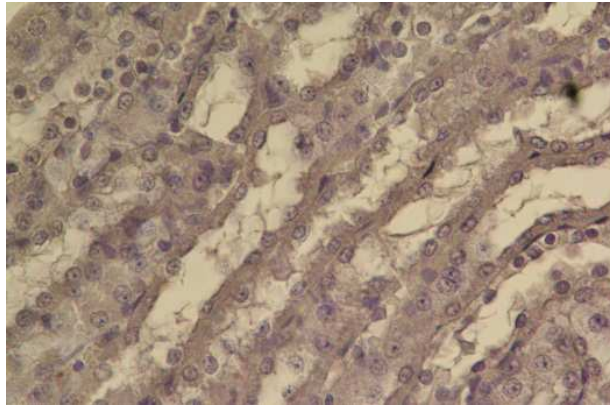
NK X400

PK X400



SS X400

PS X400



SP X400

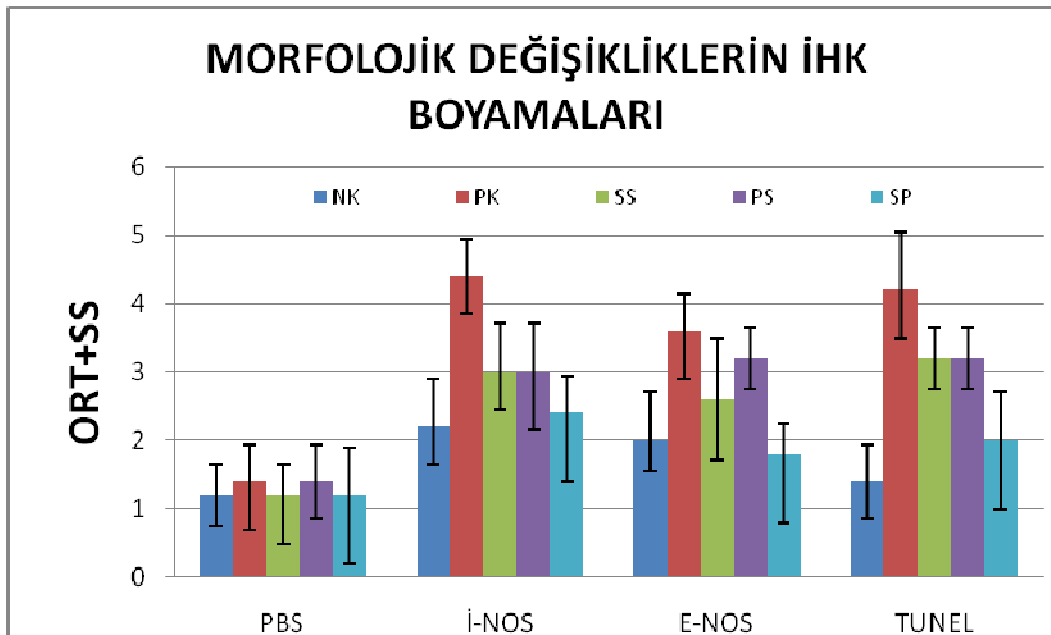
Şekil 16. TUNEL İHK Boyama Büyük Büyütme Medulla Mikroskopik Görüntüleri

Tablo 18 . TUNEL İHK Verileri ve İstatistik Sonuçları

Gruplar	Veri 1 *	Veri 2 *	p değeri
NK vs PK	1,4 ± 0,5	4,2 ± 0,8	P<0.001
NK vs SS	1,4 ± 0,5	3,2 ± 0,4	P<0.01
NK vs PS	1,4 ± 0,5	3,2 ± 0,4	P<0.01
NK vs SP	1,4 ± 0,5	2 ± 0,7	P>0.05
PK vs SS	4,2 ± 0,8	3,2 ± 0,4	P>0.05
PK vs PS	4,2 ± 0,8	3,2 ± 0,4	P>0.05
PK vs SP	4,2 ± 0,8	2 ± 0,7	P<0.001
SS vs PS	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	P>0.05
SS vs SP	3,2 ± 0,4	2 ± 0,7	P<0.05
PS vs SP	3,2 ± 0,4	2 ± 0,7	P<0.05

*Veriler semi-kantitatif skorlama puanlarıdır.

İHK boyamalarında özgün olmayan boyanmanın ayırt edilmesi amaçlı primer antikorun yerine PBS kullanılan örneklerde boyamaların özgün olduğu ve gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) belirlendi. Artan NOS boyamalarının işaret ettiği serbest radikallerle oluşan stresin hücre ölümüne etkisinin, apoptozu gösteren TUNEL İHK boyamalarında var olduğu saptandı ve litojene bağlı anlamlı bir şekilde artan bu mekanizma ile ölmekte olan apoptotik hücre varlığının özellikle kombine tedavi grubunda anlamlı bir şekilde ($p<0.001$) azaldığı bulundu (Şekil 17). Apoptoziste tespit edilen azalma, PK grubu ile SS ve PS grupları arasında anlamlı olarak bulunmasa da ($p>0.05$), kombine tedavi ile elde edilen sonuç diğer tedavi gruplarından anlamlı olarak farklı saptandı ($p<0.05$).



Şekil 17. Grupların İHK Boyama Sonuçları Açısından Karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Üriner sistem taş hastalığı, tarihi milattan önce 4800'lü yıllara uzanan bilinen en eski hastalıklardan biri olsa da, taş oluşum fizyopatolojisi halen tam olarak aydınlatılamamıştır (3). Üriner sistemi etkileyen en sık 3. patoloji olmasının yanısıra, hayat boyu semptomatik taş hastalığı prevalansı erkeklerde %13, kadınlarda %7 gibi yüksek oranlara sahiptir (1). Taş hastalığının üroloji pratiğindeki önemini yüksek rekürrens oranlarına sahip olması da arttırmaktadır. Taş hastalığındaki rekürrens oranlarına baktığımızda, ilk taşların 1 yıl içinde %15 ve 5 yıl içinde %50 gibi yüksek değerlerde olduğu izlenmektedir (2). Gerek SWL, gerekse endoürolojik tedavilerin altın çağını yaşadığımız 21. yüzyılda, taş hastalığı yüksek başarı ile tedavi edilebilirse de, yüksek nüks oranları nedeni ile koruyucu tedaviler de büyük öneme sahiptir. Taşın ilk tedavisinden sonra herhangi bir koruyucu tedavi verilmediğinde 3 yıl içinde yaklaşık % 40 gibi yüksek bir oranda rekürrensten söz etmek mümkündür (19). Cerrahi yöntemler ile nüks hızının azaltılamaması, daha az invaziv tedavi yöntemlerinin yanısıra, taş oluşum patofizyolojisi konusunda yapılan araştırmaların ve koruyucu medikal tedavinin de önemini vurgulamaktadır.

Hiperoksalüri, idiyopatik CaOx taşlarının gelişiminde en önemli risk faktörü olarak yer almaktadır. Daha önce bu konu üzerinde gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda renal epitelyal hücrelerle CaOx kristallerinin ya da tek başına oksalat iyonlarının renal tübüler epitel hücrelerinde oluşturduğu hasarın üriner sistemde taş oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir. Sıçanlarda hiperoksalüri oluşturularak gerçekleştirilen CaOx taş modeli, iyi anlaşılmış ve deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir modeldir (26).

Bu çalışmada sıçan deney modelinde EG %0.75 ve AC %1 uygulaması ile hiperoksalüri oluşturularak sildenafil sitrat, KCit ve kombine sildenafil sitrat + KCit koruyucu tedavi seçeneklerinin taş oluşumu üzerindeki önleyici etkisini değerlendirmeyi amaçladık. Uygulanan litojenlere bağlı böbrek dokularında oluşan değişiklikler biyokimyasal ve morfolojik olarak incelendi ve protein düzeyinde gerçekleşen histopatolojik bulgular NOS ve TUNEL İHK ile oksidatif stres ve apoptoz hücre ölümü açısından değerlendirildi. Alınan verilerin histolojik incelemeleri mikroskop aracılı olarak yapılırken sonuçların genel değerlendirilmesinde morfometrik analiz kullanıldı. Çalışmanın sonuçlarında litojen uygulaması ile deneysel model başarılı bir biçimde gerçekleştirildi ve pozitif kontrol grubunda literatürdeki benzer çalışmalarda saptanan kristalüri, renal kalsiyum artışı ve histopatolojik değişikliklere paralel sonuçlar alındı. Oluşan hasarın ortaya çıkardığı histopatolojik bulguların oksidatif strese bağlı serbest radikaller aracılığı ile gerçekleştiği

gösterildi. Bu konudaki sonuçlar, iNOS ve eNOS boyamaları ile desteklendi. Oksidatif strese bağlı olarak gerçekleşen apoptozis, TUNEL yöntemi ile ortaya kondu.

Litojen uygulamalarına bağlı biyokimyasal değişiklikler önceki çalışmalarda gösterilmiş ve bizim kullandığımız yöntemin doğruluğunu destekler biçimde 14 gün süre sonunda idrar örneklerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış hiperoksalüri olduğu saptanmıştır (45-50). İdrarda saptanan kalsiyum değeri açısından litojen tedavi olarak AC %1 uygulanan gruplarımız ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($p<0.001$). Literatürde benzer litojen uygulaması ile gerçekleştirilen çalışmalarda da kalsiürinin arttığı saptanmıştır (48).

KCit uygulanan grupta kalsiüri, sildenafil sitrat monoterapi ve PK gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). KCit'in insanlarda kullanımı ile idrar oksalat düzeylerinin değişmediği, idrar kalsiyum düzeylerinin ise aynı kaldığı veya azaldığı bilinmektedir (51). Sıçan modelinde elde ettiğimiz veriler bu durum ile özellikle idrar oksalat düzeyi açısından çelişki oluşturmaktadır, ancak bulgularımız literatürdeki diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (46). Ayrıca KCit'in, şelasyon oluşturarak idrarda kalsiyum iyon aktivitesini kısıtlamakta olduğu ve sonuç olarak CaOx formasyonunu engelleyerek sıçan modelinde idrarda yüksek oksalat atılımına yol açtığı ifade edilmiştir (48). Sildenafil sitrat perspektifinden bakıldığında ise, SS grubu ile kalsiüri ve oksalüri açısından PK grubu arasında anlamlı fark izlenmemektedir ($p>0.05$). Çalışmamızda elde edilen bu sonuçlar, Huang HS ve ark.'nın antioksidan E vitamini uygulaması ile elde ettiği sonuçlar ile benzerlik göstermektedir (47). Belirtilen çalışmada hiperoksalüriye bağlı renal hasarın osteopontin ve Tamm-Horsfall proteinlerini azalttığı saptanmıştır. Antioksidan tedavi ile bu antikristalizasyon moleküllerinin doku ve idrar konsantrasyonlarının korunduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda, NK grubu ile PK grubu arasında kristalüri açısından anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.001$). İdrar mikroskopik bakısında kristalürinin başlaması literatürde yer alan bulgular ile uyumludur (49,50). Çalışmamızda KCit uygulaması ile idrar kristallerinde azalma saptanmıştır ancak bu fark anlamlı değildir ($p>0.05$). Sildenafil sitratın ise mono veya kombine koruyucu tedavi olarak uygulandığında kristalüriyi azalttığı ($p<0.01$) sonuçlarımıza yansımaktadır. Bu durum açısından sildenafil sitrat ile azaldığını bulduğumuz morfolojik ve apoptotik hasarın, Randall plağı hipotezi ile ilişkili olduğu ve tübüler hücrelerin korunmasının kristal oluşumunu azalttığı düşünülebilir (5,25). Farklı bir bakış açısı ile, sildenafil sitrat uygulaması ile elde edilen antioksidan etkinin, vitamin E uygulamasına benzer (47) şekilde antikristalizasyon molekülleri üzerinde olumlu etki oluşturabileceği de speküle edilebilir.

Çalışmamızda litojen uygulaması ile renal kalsiyum düzeylerinde anlamlı artış izlenmektedir ($p<0.001$). İzlenen bu artış, literatürde benzer şekilde gerçekleştirilen deneysel modeller ile uyumlu olarak saptanmıştır (49,52). Koruyucu tedavi gruplarımızda ise renal kalsiyum düzeyinin anlamlı olarak azaldığı izlenmektedir ($p<0.001$). Bu durum, koruyucu tedavinin renal kristalizasyon üzerinde azaltıcı bir etki oluşturduğunu göstermektedir. Renal CaOx kristal birikimi, aynı zamanda hücreler üzerinde oksidatif stres ve hasar oluşturmaktadır (4). Oksidatif stresin, negatif morfolojik değişikliklerin ve apoptozisin düşük saptandığı gruplarımız olan tedavi gruplarında, renal kalsiyum düzeyinin de düşük izlenmiş olması bu açıdan anlamlıdır. Sildenafil sitrat mono ve kombine tedavisi ile, PS grubu karşılaştırıldığında, daha düşük renal kalsiyum düzeyleri saptanmıştır ($p<0.001$)

Oluşan hasarın oksidatif stres ile ilişkisi önceki çalışmalarda gösterilmiş ve nitroz proteinlerin taş oluşumu ile etkileşimi ayrıca jukstaglomerüler aparatta NO üretimi gerçekleştiği bilinmektedir. NADPH-diaphorase ve eNOS boyamaları ile ortaya konan oksidatif stresin L-arginin uygulaması ile azaltıldığı gösterilmiştir (53). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde hiperoksalüriye bağlı artmış NOS immunoreaktivitesi SS, PS ve SP gruplarında anlamlı olarak azalmış izlenmiştir ($p<0.001$) ve bu azalma ile histolojik değişiklikler de olumlu yönde etkilenmektedir. SOD düzeylerinin ise sadece sildenafil sitrat tedavi gruplarında PK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artış gösterdiği izlenmektedir ($p<0.05$). Literatürde benzer bir çalışma Akanee W ve ark. tarafından gerçekleştirilmiş ve antioksidan içeriği olan orthosiphon grandiflorum bitkisi ile yapılan tedavinin KCit tedavisi ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha fazla SOD enzim aktivitesi yaptığı bulunmuştur (46).

Hücre lipidlerinin peroksidasyonu ile oluşan MDA, oksidatif hasar derecesini belirlemektedir. Literatürde MDA'nın üriner atılımının hiperoksalüri modelinde arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (47,52). Çalışmamızda böbrek doku homojenatında MDA düzeylerini değerlendirdiğimizde, PK grubunda NK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış olduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Ayrıca doku MDA düzeylerinin tüm tedavi gruplarında da PK grubu ile karşılaştırıldığında azaldığı izlenmektedir ($p<0.001$). Bu durum, oluşturduğumuz taş modelinde oksidatif strese bağlı renal hasar gerçekleştiğini doğrulamaktadır.

Çalışmamızda morfolojik inceleme örneklerimizde kristal oluşumu, glomerül hasarı, damarlarda genişleme ve eritrosit birikimi, tübüllerde CaOx kristalleri birikimi, dilatasyon ve inflamasyon izlenmiş ve semi kantitatif olarak skorlanmıştır. Saptadığımız değişiklikler benzer çalışmalarda da rapor edilmiştir (49,50). Litojen ajan uygulaması ile bu değişikliklerin NK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı saptanmıştır ($p<0.001$). Özellikle

kombine tedavi grubumuzda bu değişikliklerin PK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır.

Hasarın oluşmasında oksidatif stres etkisinin gösterilmesi sonrasında mikroskopik değerlendirilme yapıldığında böbrek dokularında nekrotik bir patolojinin görülmemesi de oluşan hasarın apoptotik mekanizma ile gerçekleştiğini desteklemektedir. Yapılan TUNEL IHK boyamalarında apoptotik hücrelerin görülmesi ve PK grubunda NK grubu ile karşılaştırdığımızda saptanılan anlamlı fark ($p<0.001$), oksidatif stres ortamının hücreleri apoptoz ile ölüme sürüklendiğini göstermektedir. Çalışmamızda oluşan apoptotik değişikliklerin SS, PS ve SP gruplarında azaldığı, özellikle kombine tedavi grubunda bu farkın anlamlı olduğu ($p<0.001$) izlenmektedir. Daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada hiperoksalüriye bağlı olarak iskemi olduğu, korteks, medulla ve papiller bölgelerde yer aldığı saptanmış ayrıca taş grubu ve E vitamini grubu ile verapamil grubu karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir (30). Bir başka çalışmada ise tübüllerde görülen apoptotik hücrelerin hiperoksalüriye bağlı olarak belirgin bir şekilde arttığı ve E vitamini ve verapamil ile bu artışın engellendiği saptanmıştır (54). Huang HS ve ark.'nın gerçekleştirdiği çalışmada ise E vitamini uygulanmasının apoptotik değişiklikleri azalttığı saptanmıştır (47). Bu çalışmalarda özellikle E vitamini ile elde edilen sonuçlar arasında bazı tutarsızlıklar yer alsa da, artan oksalat ile üretilen serbest radikallerin ve iskeminin, hücre ölümünü indüklediği saptanmıştır. Oluşan bu değişiklikler hem antioksidan ajanlar ile, hem de kan akımını arttırıcı ajanlar ile sınırlanabilmektedir.

6. SONUÇ

Ürolitiazis klinik pratiğimizde sık karşılaşılan bir durum olmasına karşın, taş hastalığı fizyopatolojisi henüz tam net aydınlatılamamış ve koruyucu tedavide edinilen gelişmeler, cerrahi yaklaşımın gerisinde kalmıştır. Bu açıdan gerçekleştirilen deneysel çalışmalar kompleks bir sürecin ayrı kısımlara bölünerek incelenebilmesini sağlamanın yanısıra, bir bütün olarak da ele alınabilmesine izin vermektedir.

Çalışmamız taş hastalığını sıçan modelinde incelemektedir ve uyguladığımız litojenler ile model başarı ile oluşturulmuştur. Litojen medikasyon ile eş zamanlı başladığımız sildenafil sitrat ve potasyum sitratın, ayrı ayrı ve birlikte koruyucu etkileri incelenmiştir.

Taş oluşumunu azaltmaya yönelik deneysel aşamada birçok molekül bulunmaktadır ve sildenafil sitrat da bu seçenekler arasında önemli bir aday haline gelmiştir. Çalışmamızda, hiperoksalürinin böbrek dokusunda oksidatif hasar ve apoptozis oluşturduğu, ve bu renal tübüler hasarın sildenafil sitrat kullanımı ile azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca sildenafil sitrat ile daha düşük düzeylerde renal kalsiyum birikimi ve kristalüri saptanmıştır. Bu açıdan sildenafil sitrat, gelecekte taş hastalığı tedavisinde yer alabilir. Ancak oluşturduğu biyokimyasal ve immünohistokimyasal değişikliklerin anlaşılması ve klinik kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi için yeni deneysel ve moleküler çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Demirel A, Adanur S. Üriner Sistem Taş Hastalığı Epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri J Urology-Special Topics 2009;2(3):1-5.
2. Tiselius HG. Epidemiology and medical management of stone disease. BJU Int. 2003; 91:758–767.
3. Pearle MS, Lotan Y. Urinary Lithiasis: Etiology, Epidemiology and Pathogenesis In: Campbell-Walsh Urology, – 10th ed. / editor-in-chief, Alan J. Wein ; editors, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA ,Vol.1, 1257-1286, 2012.
4. Thamilselvan S, Khan SR. Oxalate and calcium oxalate crystals are injurious to renal epithelial cells: results of in vivo and in vitro studies. J Nephrol. 1998 11:66.
5. Bagga HS, Chi T, Miller J, Stoller ML. New insights into the pathogenesis of renal calculi. Urol Clin North Am. 2013 Feb;40(1):1-12. doi: 10.1016/j.ucl.2012.09.006. Epub 2012 Oct 23.
6. Khan SR. Nephrocalcinosis in animal models with and without stones. Urol Res. 2010 Dec;38(6):429-38. doi: 10.1007/s00240-010-0303-4. Epub 2010 Jul 24.
7. Küçük A, Yucel M, Erkasap N, Tosun M, Koken T, Ozkurt M, Erkasap S. The effects of PDE5 inhibitory drugs on renal ischemia/reperfusion injury in rats. Mol Biol Rep. 2012 Oct;39(10):9775-82. doi: 10.1007/s11033-012-1843-1. Epub 2012 Jun 27.
8. Jeong KH, Lee TW, Ihm CG, Lee SH, Moon JY, Lim SJ.Effects of sildenafil on oxidative and inflammatory injuries of the kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. Am J Nephrol. 2009;29(3):274-82. doi: 10.1159/000158635. Epub 2008 Sep 24.
9. Bae EH, Kim IJ, Joo SY, Kim EY, Kim CS, Choi JS, Ma SK, Kim SH, Lee JU, Kim SW. Renoprotective effects of sildenafil in DOCA-salt hypertensive rats. Kidney Blood Press Res. 2012;36(1):248-57. doi: 10.1159/000343414. Epub 2012 Nov 21.
10. Dere F. Anatomi. Okullar Pazarı Kitabevi. 1990 Adana 2. baskı. S: 655-672.
11. Mettler Fred. A. Essentials of Radiology, Elsevier Saunders Çev. Güney Ş. İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul 2008 1. Baskı, s: 213.
12. Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology pp: 359-373; 1998.
13. Guyton AC, Hall JE (Çeviri: H. Çavuşoğlu). Tıbbi Fizyoloji. İstanbul Nobel Kitabevi.10. baskı; 2001. s.280-2.
14. Penbegül N. Ürogenital Sistem Embriyolojisi. In: Türk Üroloji Yeterlilik Kurulları Ders Notları Kitabı; 2010 s: 31-40

15. Matlaga BR, Assimos DG. Changing indications of open stone surgery. *Urology* 2002; 59: 490-494.
16. Kim HH, Jo MK, Kwak C, Park SK, Yoo KY, Kang D, Lee C. Prevalence and epidemiologic characteristics of urolithiasis in Seoul, Korea. *Urology* 2002; 59: 517-521.
17. Ramello A, Vitale C, Marangella M. Epidemiology of nephrolithiasis. *J Nephrol.* 2000;13:S45–50.
18. Akinci, M., T. Esen, and S. Tellaloglu, Urinary stone disease in Turkey: an updated epidemiological study. *Eur Urol*, 1991. 20(3): p. 200-3.
19. Johri, N Cooper B, Robertson W, Choong S, Rickards D, Unwin R. An update and practical guide to renal stone management. *Nephron Clin Pract*, 2010. 116(3): p. c159-71.
20. Sharma AP, Filler G. Epidemiology of pediatric urolithiasis. *Indian J Urol*, 2010. 26(4): p. 516-22.
21. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N: Üriner sistem taş hastalığı. *Temel Üroloji* 3. baskı, Güneş Kitabevi, 2007; 621-646.
22. Caudarella R, Rizzoli E, Buffa A, Bottura A, Stefoni S: Comparative study on the influence of 3 types of mineral water in patients with idiopathic calcium lithiasis. *J Urol* 1998; 159: 658-663
23. Rodgers AL: Effect of mineral water containing calcium and magnesium on calcium oxalate urolithiasis risk factors. *Urol Int* 1997; 58: 93-99
24. Hess B, Mauron H, Ackermann D, Jaeger P: Effects of a common sense diet on urinary composition and supersaturation in patients with idiopathic calcium urolithiasis. *Eur Urol* 1999; 36: 136-143.
25. Evan A, Lingeman J, Coe FL, Worcester E. Randall's plaque: pathogenesis and role in calcium oxalate nephrolithiasis. *Kidney Int.* 2006 Apr;69(8):1313-8.
26. Khan SR. Animal models of kidney stone formation: an analysis. *World J Urol* 1997; 15:236.
27. Green ML, Hatch M, Freel RW. Ethylene glycol induces hyperoxaluria without metabolic acidosis in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005; 289: F536–F543,.
28. Lyon ES, Borden TA, Vermeulen CW Experimental oxalate nephrolithiasis produced with ethylene glycol. *Invest Urol.* 1966 4:143-151.
29. Lee YH, Huang WC, Chiang H, Chen MT, Huang JK, Chang LS (1992) Determinant role of testosterone in the pathogenesis of urolithiasis in rats. *J Urol* 147:1134-1138

30. Tanriverdi O, Telci D, Aydin M, Ekici ID, Miroglu C, Sarica K. Hyperoxaluria-induced tubular ischemia: the effects of verapamil and vitamin E on apoptotic changes with an emphasis on renal papilla in rat model. *Urol Res.* 2012 Feb;40(1):17-25. doi: 10.1007/s00240-011-0388-4. Epub 2011 May 24.
31. El Sabbahy M, Vaidya VS. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2011 Sep-Oct;3(5):606-18. doi: 10.1002/wsbm.133. Epub 2010 Dec 31.
32. Wilcox CS. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther.* 2010 May;126(2):119-45. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.01.003. Epub 2010 Feb 11.
33. Atilgan D, Parlaktas BS, Uluocak N, Erdemir F, Firat F, Erkorkmaz U, Saylan O. Effects of melatonin on partial unilateral ureteral obstruction induced oxidative injury in rat kidney. *Urol Ann.* 2012 May;4(2):89-93. doi: 10.4103/0974-7796.95552.
34. Hagar HH, Abd El Tawab R. Cysteinyl leukotriene receptor antagonism alleviates renal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res.* 2012 Nov;178(1):e25-34. doi: 10.1016/j.jss.2012.02.022. Epub 2012 Mar 30.
35. Knowless RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994;298:249.
36. Mates JM. Effect of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 2000; 153; 83-104
37. Valko M, Leibfritz D, Micol J, Cronin M.T.D, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology.* 2007; 39; 44-84.
38. Whyllie A, Kerr JFR, Currie AR. Cell death : The significance of apoptosis, *Int Rev Cytol.* 1980; 68; 251-305
39. Cummings MC, Winterford C, Walker N. Apoptosis *Histology for Pathology.* 1997: 3-8.
40. Glossmann, H., Petrischor, G., Bartsch, G.,. Molecular Mechanisms of The Effects of Sildenafil, *Experimental Gerontology,* 1999; 34, 305-318 p.
41. Robinson MR, Leitao VA, Haleblan GE, Scales CD Jr, Chandrashekar A, Pierre SA, Preminger GM. Impact of long-term potassium citrate therapy on urinary profiles and recurrent stone formation. *J Urol.* 2009 Mar;181(3):1145-50. doi: 10.1016/j.juro.2008.11.014. Epub 2009 Jan 18.

42. Zuo J, Khan A, Glenton PA, Khan SR. Effect of NADPH oxidase inhibition on the expression of kidney injury molecule and calcium oxalate crystal deposition in hydroxy-L-proline-induced hyperoxaluria in the male Sprague-Dawley rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jun;26(6):1785-96. doi: 10.1093/ndt/gfr035. Epub 2011 Mar 4.
43. Ozbal S, Ergur BU, Erbil G, Tekmen I, Bagrıyanık A, Cavdar Z. The effects of α -lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in Rats. *ScientificWorldJournal*. 2012; 2012:489248. doi: 10.1100/2012/489248. Epub 2012 Oct 24.
44. Bashir S, Gilani AH. Antiurolithic effect of berberine is mediated through multiple pathways. *Eur J Pharmacol*. 2011 Jan 25;651(1-3):168-75. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.10.076. Epub 2010 Nov 27.
45. Li Y, McMartin KE. Strain differences in urinary factors that promote calcium oxalate crystal formation in the kidneys of ethylene glycol-treated rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 May;296(5):F1080-7. doi: 10.1152/ajprenal.90727.2008. Epub 2009 Feb 25.
46. Akanae W, Tsujihata M, Yoshioka I, Nonomura N, Okuyama A. *Orthosiphon grandiflorum* has a protective effect in a calcium oxalate stone forming rat model. *Urol Res*. 2010 Apr;38(2):89-96. doi: 10.1007/s00240-010-0265-6. Epub 2010 Mar 10.
47. Huang HS, Chen J, Chen CF, Ma MC. Vitamin E attenuates crystal formation in rat kidneys: roles of renal tubular cell death and crystallization inhibitors. *Kidney Int*. 2006 Aug;70(4):699-710.
48. Vanachayangkul P, Chow N, Khan SR, Butterweck V. Prevention of renal crystal deposition by an extract of *Ammi visnaga* L. and its constituents khellin and visnagin in hyperoxaluric rats. *Urol Res*. 2011 Jun; 39(3):189-95. doi: 10.1007/s00240-010-0333-y. Epub 2010 Nov 11.
49. Patel PK, Patel MA, Vyas BA, Shah DR, Gandhi TR. Antiurolithiatic activity of saponin rich fraction from the fruits of *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. (Solanaceae) against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *J Ethnopharmacol*. 2012 Oct 31;144(1):160-70. doi: 10.1016/j.jep.2012.08.043. Epub 2012 Sep 5.
50. Albayrak A, Bayir Y, Halici Z, Karakus E, Oral A, Keles MS, Colak S, Zipak T, Dorman E, Uludag K, Yayla N, Gulcan E. The biochemical and histopathological investigation of amlodipine in ethylene glycol-induced urolithiasis rat model. *Ren Fail*. 2013;35(1):126-31. doi: 10.3109/0886022X.2012.731999. Epub 2012 Dec 20.

51. Ferrandino MN, Pietrov PK, Preminger GM. Evaluation and Medical Management of Urinary Lithiasis In: Campbell-Walsh Urology, – 10th ed. / editor-in-chief, Alan J. Wein ; editors, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA ,Vol.1, 1287-1323, 2012.
52. Moriyama MT, Suga K, Miyazawa K, Tanaka T, Higashioka M, Noda K, Oka M, Tanaka M, Suzuki K. Inhibitions of urinary oxidative stress and renal calcium level by an extract of *Quercus salicina* Blume/*Quercus stenophylla* Makino in a rat calcium oxalate urolithiasis model. *Int J Urol*. 2009 Apr;16(4):397-401.
53. Pragasam V, Sakthivel R, Kalaiselvi P, Rajesh NG, Varalakshmi P. Detection of endothelial nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in experimentally induced hyperoxaluric animals. *Urol Res*. 2005 Aug;33(4):301-8. Epub 2005 Jul 9.
54. Sarica K, Erbagci A, Yağci F, Bakir K, Erturhan S, Uçak R. Limitation of apoptotic changes in renal tubular cell injury induced by hyperoxaluria. *Urol Res*. 2004 Aug; 32(4):271-7. Epub 2004 Jul 13.