



T.C.

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**ETİLEN GLİKOLLE İNDÜKLENMİŞ
NEFROLİTİYAZİSLİ RATLARDA MORUS
NİGRA EKSTRESİNİN TAŞ OLUŞUMUNDA
KORUYUCU ETKİNLİĞİ**

DR. MUHAMMET DEMİR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

2022



T.C.

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**ETİLEN GLİKOLLE İNDÜKLENMİŞ
NEFROLİTİYAZİSLİ RATLARDA MORUS
NİGRA EKSTRESİNİN TAŞ OLUŞUMUNDA
KORUYUCU ETKİNLİĞİ**

DR. MUHAMMET DEMİR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANLARI: DOÇ. DR. ERAY KEMAHLI ve

DR. ÖĞR. ÜYESİ EMRULLAH SÖĞÜTDELEN

BOLU 2022

ETİK KURUL ONAY BELGESİ



T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 32
Konu: Kararlar

25.6.2021

BASVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Etilen glikolle indüklenmiş nefrolitiazisli ratlarda morus nigra ekstresinin tedavideki etkinliği.
	ARAŞTIRMANIN İNGLİZCE ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Treatment efficacy of morus nigra extract in rats with ethylene glycol-induced nephrolithiasis.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Doç.Dr.Eray KEMAHLI
	DiĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Arş.Gör.Dr.Muhammet DEMİR, Doç.Dr.Özgür Mehmet YİS, Prof.Dr.Müttalip GÜNDOĞDU, Uzm.Dr.Alican ÜNAL, Dr.Öğr.Üyesi Emrullah SÖĞÜTDELEN, Prof.Dr.Üğur ÜYETÜRK
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2021/22	Tarih (Date): 09.06.2021
	Doç.Dr.Eray KEMAHLI'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın 28 adet Sıçan ile gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık alanı	Kurumu	İmzası
Prof.Dr. İdris TÜREL (Başkan)	Farmakoloji AD. Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof.Dr. Seyit Ali KAYIŞ (Başkan Yardımcısı)	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Yeşim YENER (Üye)	Temel Eğitim Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Eğitim Fakültesi	
Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cerrahi AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof.Dr. Uğur ÜYETÜRK (Üye)	Üroloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç.Dr. Mustafa DİLEK (Üye)	Çocuk Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç.Dr. Ayhan ÇETINKAYA (Üye)	Fizyoloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç.Dr. ÖZGÜR Mehmet YİS (Üye)	Biyokimya AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Hayriye SOYTÜRK (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi *	
Dr.Öğr. Üyesi Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Canan AKÜNAL TÜREL (Üye)	Nöroloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Veteriner Hekim Enes EĞİLMEZ (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	BAİBÜ Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi	
Veteriner Hekim Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLU BEYPILIÇ AŞ.	
Av.Cihan YAVUZ (TC.Üyesi)	Avukat	Aşağı Soku Mah. Şair Şinasi Sok. Ayşe Hanım Apt.24/6 BOLU	

ETİK İLKELERE UYULDUĞUNA İLİŞKİN BEYAN

Tıpta uzmanlık tezi olarak sunduğum “Etilen glikolle indüklenmiş nefrolitiyazisli ratlarda *Morus nigra* ekstresinin taş oluşumunda koruyucu etkinliği” başlıklı çalışmanın yazılmasında bilimsel ve etik kurallara uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda atıfta bulunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin tamamının ya da bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitede bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

20/08/2022

Dr. Muhammet Demir

TEZ ONAY BELGESİ



TEŞEKKÜR

Eğitim sürecim boyunca mesleki bilgi ve deneyimi kazanmamda emeği geçen değerli hocam Ana bilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ahmet Metin'e,

Tez danışmanlarım Doç. Dr. Eray Kemahlı ve Dr. Öğr. Üyesi Emrullah Söğütülen'e,

Deđerli hocalarım Prof. Dr. Uğur Üyetürk ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Alperen Yıldız'a,

Birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve klinikteki çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her zaman ve her koşulda yanımda olan emekleri ödenemeyecek canım anneme, babama ve ablama,

Her konuda olduğu gibi bu süreçte de bana destek olan, varlığını hissettiren sevgili eşime

sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ETİK KURUL ONAY BELGESİ	i
ETİK İLKELERE UYULDUĞUNA İLİŞKİN BEYAN	ii
TEZ ONAY BELGESİ	iii
TEŞEKKÜR	iv
TABLO DİZİNİ	vi
ŞEKİL DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Üriner Sistem Taşlarının Tarihiçesi.....	3
2.2. Üriner Sistem Taşlarının Epidemiyolojisi	3
2.3. Taş Oluşum Mekanizmaları	4
2.3.1. Taş Oluşum Aşamaları	5
2.3.1.1. Süpersaturasyon.....	5
2.3.1.2. Nükleasyon	5
2.3.1.3. Kristalizasyon, Agregasyon ve Retansiyon.....	6
2.3.2. Kristal Oluşumunda İnhibitör ve Promoter Faktörler	7
2.4. Taş Oluşumunu Önleme ve Tedavi Yöntemleri.....	9
2.5. <i>Morus nigra</i> (Karadut)	9
3. GEREÇ ve YÖNTEM	11
3.1. Deney Hayvanları.....	11
3.2. Deney Protokolü.....	12
4. BULGULAR	15
4.1. Serum Biyokimyasal Parametrelerin Karşılaştırılması	15
4.2. İdrar Parametrelerinin Karşılaştırılması	19
4.3. Histopatolojik Parametrelerin Karşılaştırılması	22
5. TARTIŞMA	24
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	29
7. KAYNAKÇA	30

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Taş oluşumunu etkileyen inhibitör ve promoterler (14)	8
Tablo 2: Üriner sistem taşlarının tipi ve özellikleri (11).....	8
Tablo 3: Ratların ortalama ağırlıkları	12
Tablo 4: Grupların serum parametrelerine göre karşılaştırılması	18
Tablo 5: Grupların idrar parametrelerine göre karşılaştırılması.....	19



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Kristal konsantrasyonlarına göre saturasyon bölgeleri (9).....	6
Şekil 2: Wistar tipi erişkin ratlar.....	11
Şekil 3: Metabolik kafeslere alınan ratlar	13
Şekil 4: Sakrifiye edildikten sonra alınan böbrek.....	13
Şekil 5: Serum Ca değerlerinin dağılımı.....	15
Şekil 6: Serum Mg değerlerinin dağılımı.....	16
Şekil 7: Serum total tiyol değerlerinin dağılımı	16
Şekil 8: Serum nativ tiyol değerlerinin dağılımı	17
Şekil 9: Serum disülfid değerlerinin dağılımı.....	17
Şekil 10: İdrar kristal yoğunluğu değerlerinin dağılımı.....	20
Şekil 11: Gruplara göre idrar kristali mikroskopik görüntüleri.....	21
Şekil 12: Grupların standart ışık mikroskobu ve polarize ışık altında görüntüleri	23

KISALTMALAR

NHANES	: Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi
MI	: Miyokard İnfarktüs
RNA	: Ribonükleik asit
mg/dL	: miligram/desilitre
mmol/L	: milimol/litre
µmol/L	: mikromol/litre
EG	: Etilen Glikol
PS	: Potasyum Sitrata
MN	: Morus Nigra

ÖZET

Amaç: Ülkemizde ve dünyada taş hastalığından korunmada birçok bitkisel ürün kullanılmaktadır. Bu bitkisel ürünlerin faydalı olup olmadığı bilimsel çalışmalarla ortaya konulmalıdır. *M. nigra* içerdiği fenoller ve flavonoidler sayesinde antioksidan etkinliği oldukça yüksek bir meyvedir. Çalışmanın amacı *M. nigra*'nın taş oluşumunda koruyucu etkinliği olup olmadığını potasyum sitratla karşılaştırarak araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 28 adet erişkin Wistar tipi rat dört gruba ayrıldı. I. Grup kontrol grubu olarak sadece su ile, II. Grup %0,75'lik etilen glikol ile, III. Grup %0,75'lik etilen glikol ve rat başına 0,4 mEq/gün potasyum sitrat ile, IV. Grup %0,75'lik etilen glikol ve rat başına 800 mg/kg/gün *M. nigra* ekstresi ile 28 gün boyunca laboratuvar şartlarında oral gavaj yoluyla beslendi. Ratlar 28 günün sonunda 24 saatlik idrar toplanması amacıyla metabolik kafeslere alındı. Sonrasında ratlar sakrifiye edilerek serumda Üre, Cr, Na, Ca, Mg, K, Cl, Total Tiyol, Nativ Tiyol, Disülfid ve idrarda kristal, lökosit, pH değerleri çalışıldı. Böbrek dokularının histolojik kesitlerinde kristal yapıları incelendi.

Bulgular: Etilen glikol grubunda ($40\pm 6,33$ $\mu\text{mol/L}$) disülfid seviyesi potasyum sitrat grubuna ($32,17\pm 4,48$ $\mu\text{mol/L}$) göre anlamlı derecede yüksekti ($p=0,04$). Disülfid değerleri *M. nigra* grubunda ($37,67\pm 6,09$ $\mu\text{mol/L}$) etilen glikol grubuna göre anlamlı fark olmasa da daha düşüktü. İdrar kristal yoğunluğu *M. nigra* grubunda [289 ($19-340$) $n/\mu\text{L}$], etilen glikol grubuna [1099 ($507-1178$) $n/\mu\text{L}$] göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha düşüktü ($p=0,016$).

Sonuç: *M. nigra*'nın idrarda ve böbrek patoloji kesitlerinde kristal yoğunluğunu anlamlı derecede azalttığı, antioksidatif etkinliği sayesinde serum analizinde oksidatif parametrelerde düşüş sağladığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Morus nigra*, Nefrolitiazis, Kristalizasyon, Böbrek Taşı, Tiyol-Disülfid, Potasyum Sitrat

ABSTRACT

Background: Many herbal products are used in the prevention of stone disease in our country and in the world. Whether these herbal products are beneficial or not, they should be demonstrated by scientific studies. *M. nigra* is a fruit with high antioxidant activity that it contains phenols and flavonoids. The aim of the study is to investigate that *M. nigra* has a protective effect in stone formation by comparing it with potassium citrate.

Material and Methods: Twenty-eight Wistar-type rats obtained from Experimental Animals Research Center of Bolu Abant Izzet Baysal University were divided into four groups. Group I as the control group was fed with only water, Group II was fed with 0.75% of ethylene glycol, Group III was fed with 0.75% of ethylene glycol and 0.4 mEq/day of potassium citrate per rat, and Group IV was fed with 0.75% of ethylene glycol and 800 mg/kg/day of *M. nigra* extract per rat for 28 days by oral gavage under laboratory conditions. At the end of 28 days, rats were taken into metabolic cages for 24-hour urine collection. Afterwards, the rats were sacrificed and serum Urea, Cr, Na, Ca, Mg, K, Cl, Total Thiol, Native Thiol, Disulphite and urine crystal, leukocytes, pH were studied. Crystal structures of kidney tissues were examined in histological sections.

Results: The disulfide level of the ethylene glycol group ($40 \pm 6.33 \mu\text{mol/L}$) was significantly higher than that potassium citrate group ($32.17 \pm 4.48 \mu\text{mol/L}$) ($p=0.04$). Disulfide values of *M. nigra* group ($37.67 \pm 6.09 \mu\text{mol/L}$) were lower than the ethylene glycol group, although there was no significant difference. Crystal density of urine in the *M. nigra* group was statistically significantly lower [289 (19-340) n/ μL] than ethylene glycol group [1099 (507-1178) n/ μL] ($p=0.016$).

Conclusion: It was observed that *M. nigra* significantly reduced the crystal density of urine and pathological kidney sections, and decreased oxidative parameters in serum analysis via its antioxidative activity.

Keywords: *Morus nigra*, Nephrolithiasis, Crystallization, Kidney Stone, Thiol-Disulfide, Potassium Citrate

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Üriner sistem taşları dünyanın her yerinde görülen günümüzün önemli bir sağlık sorunudur. Dünya genelinde nüfusun %10'unu etkilemektedir (1). Avrupa ve Kuzey Amerika'da böbrek taşı insidansı yaklaşık %0,5 olmakla beraber giderek artmaktadır (2). Morbidite ve nüks oranı yüksek olan böbrek taşı hastalığının ekonomik olarak da maliyeti yüksektir (1). Böbrek taşı nedeniyle sağlık kuruluşuna başvuran hastaların 5-10 yıl içinde %50, 20 yıl içindeyse %75'e yakın oranda nüks nedeniyle tekrar başvurduğu gösterilmiştir (3). Aile öyküsünün olması, genç yaşta böbrek taşı olması, enfeksiyon taşı varlığı ve böbrek taşına sebep olabilecek metabolik ve endokrin hastalıkların varlığı nüks oranını artıran önemli etkenlerdir (2). Hastalar yan ağrısı, bulantı, kusma, idrarda kanama, ilerleyici böbrek hasarına bağlı böbrek kaybına varan farklı derecelerde semptomlarla kliniğe başvurmaktadır (3).

Klinik uygulamalarda üriner sistem taşlarının boyutu ve tipine göre farklı tedavi yöntemleri mevcuttur. Son yıllarda gelişen teknolojinin de yardımıyla üriner taşların tedavisinde artık endoskopik cerrahi standart hale gelmiştir. Endoskopide kullanılan kamera, nefroskop, üreterorenoskop, C-kollu portabl röntgen ve lazer gibi cihazların ülkelerin sağlık sistemine önemli ölçüde maliyeti olmaktadır. ABD'de üriner sistem taş hastalığının ekonomik etkisini araştıran bir çalışmada yıllık iki milyar dolar maliyete sebep olduğu bulunmuştur (4). Bu nedenle taş oluşumu önlemeye yönelik tedaviler ön plana çıkmaktadır.

Üriner sistem taş tedavi ve profilaksisine yönelik günümüzde potasyum sitrat sık kullanılan farmakolojik ajandır. Sitrat kalsiyumun barsaklardan geri emilimini ve kemiklerden rezorpsiyonunu azaltıp, böbreklerden kalsiyum geri emilimini artırarak idrar kalsiyumunu düşürmektedir. İdrar pH değerini yükselterek kalsiyumun oksalata bağlanmasını ve taş öncüllerinin oluşmasını önlemektedir (5). Uzun yıllardır kullanılan potasyum sitrat artık klavuzlarda yer almaktadır. Ayrıca son yıllarda potasyum sitrata alternatif olabilecek bitkisel ilaçların etkinliği bilimsel çalışmalarla araştırılmaktadır.

Halk arasında böbrek taşı tedavisinde kullanılan faydalı olduğuna inanılan birçok bitki ve bitkisel ürünlerin etkinlikleri araştırılmaktadır. Şu anda piyasada ürolitiazis tedavisinde kullanılan çeşitli bitkisel formülasyonlar mevcuttur (6).

Dünyanın birçok yerinde, özellikle güneydoğu asya geleneksel tıbbında çeşitli hastalıkların tedavisinde *Morus nigra* (karadut) bitkisinin meyvesi, yaprağı ve kök kısmı kullanılmaktadır. *M. nigra* bitkisinin özellikle meyve ve yaprak ekstralarının içerdiği flavonoidler, polifenoller sayesinde antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antiinflamatuvar ve antihiperlipidemik etkiler gösterdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (7).

Bu çalışmada *M. nigra* meyve ekstresinin antioksidan ve böbrek koruyucu etkisi olup olmadığı, böbrek taşı profilaksisinde etkinliğini potasyum sitrat ile karşılaştırarak araştırılması amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Üriner Sistem Taşlarının Tarihçesi

Üriner sistem taş hastalığı insanlık tarihinin başından itibaren insanları etkileyen bir hastalıktır. Tarihte üriner taşlara ait ilk kanıt Mısır' daki bir kazıda MÖ 8000'li yıllara ait bir insan iskeletinde bulunmuştur. Antik Roma'nın en önemli hekimlerinden Galen (MS 129-200) belgelerinde Suriye'de mesane taşı tedavisinde kullanılan, deniz kestanesinin milyonlarca yıllık süreçten sonra taşlaşmış hali olan Yahudi Taşı'ndan bahsetmiştir. Hipokrat yemini üriner sistem taşlarının cerrahi tedavisinin tehlikeleri ile ilgili bilgiler vermektedir. Antik çağda hekimler tedavide birçok bitkisel ve hayvansal kaynaklı ilaç kullanmışlardır. Örneğin Mezopotamya'da böbrek taşı tedavisinde mercan kullanılmıştır (8).

2.2. Üriner Sistem Taşlarının Epidemiyolojisi

Üriner taş hastalığının yaşam boyu prevalansı %1 ile %17 arasında değişmektedir. Bu oran yaş, cinsiyet, ırk ve coğrafi konuma göre değişkenlik göstermektedir (9). Yaşam boyu risk gelişmiş ülkelerde %10-15 iken Orta Doğu'da %20-25 civarındadır (2). Yapılan çalışmalar tüm dünyada hem prevalansın hem de insidansın arttığını göstermektedir (9).

ABD' de yapılan 2010 Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi'ne (NHANES) göre genel taş prevalansı %8,8 erkeklerde %10,6 iken kadınlarda %7,1 olarak bulunmuştur. Aynı anketin 1988-1996 yıllarındaki çalışmasında genel prevalansın %5,2 olduğu, son 30 yılda %70'lik bir artışın olduğu bildirilmiştir. Erkeklerde 2. dekattan sonra artan böbrek taşı insidansı 5. ve 6. dekatta pik yaparken, kadınlarda daha erken pik yapmaktadır (10). Ülkemizde ise taş prevalansı %14,8 iken doğu illerimizde %40'lara kadar çıkmaktadır (11).

Böbrek taşı riskinin ırk ve etnik kökene göre değiştiği gösterilmiştir. ABD'de böbrek taşı en sık beyaz ırkta gözlenirken, sonra hispaniklerde ve siyah ırkta görülmüştür (12). Aile öyküsü ile böbrek taşı riskinin incelendiği kırk bine yakın katılımcının olduğu bir çalışmada aile öykünde taş olanların olmayanlara göre 2,57 kat daha fazla risk altında olduğu bulunmuştur (13).

Yaşanılan coğrafya da böbrek taşı insidansını etkileyen önemli etkenlerdendir. ABD'de taş prevalansının yaşanılan enlem ve bölgeye göre

değiştirdiği gözlenmiştir. Ülkenin en güneyinde yaşayan erkeklerin en kuzeyindekilere göre %60 daha fazla risk altında olduğu bulunmuştur. Hava sıcaklığının yüksek seyrettiği güneşli gün sayısı fazla olan iklimlerde böbrek taşı sıklığının arttığı gösterilmiştir (12). Bu durum terleme ile sıvı kaybının artması ve artan D vitamini üretimine bağlanmıştır. Ülkemizde de epidemiyolojik çalışmaların verilerine göre Güney ve Güneydoğu bölgesinde böbrek taşı riski daha fazladır (14).

Diyetin böbrek taşı oluşumuna etkisini araştıran bir çalışmada hayvansal protein, ek kalsiyum, şekerli soda alımı böbrek taşı riskini artırırken taze meyve, çay, kahve ve sıvı alımının riski azalttığı bulunmuştur (12). Artan sıvı alımının böbrek taşından koruduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Farklı bölgelerde düşük kalsiyum karbonat içermesi nedeniyle yumuşak olarak sınıflandırılan içme sularının böbrek taşından daha fazla koruduğu bazı çalışmalarda belirtilse de Schwartz ve arkadaşlarının 2002 de yaptığı çalışmada bir fark bulunamamıştır (9).

Japonya'da yapılan metabolik sendromla ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada böbrek taşının obezite, hipertansiyon, gut/hiperürisemi ile arttığı ama diyabetten etkilenmediği bulunmuştur (12). Bir başka çalışmada ise böbrek taşı ile diyabet arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş, ABD'de artan taş prevalansından yaygınlaşan obezite sorumlu tutulmuştur (15). Böbrek taşının kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi net olarak aydınlatılamasa da böbrek taşı olanlarda olmayanlara göre %31 daha yüksek miyokard infarktüs (MI) insidansı bulunmuştur (9).

2.3. Taş Oluşum Mekanizmaları

Üriner sistemde taş oluşumunun temelinde iyon ve moleküllerin idrarda çözünemeyecek kadar yüksek konsantrasyonda olması yatmaktadır (9). Sınır konsantrasyonu etkileyen başta pH ve sıcaklık gibi birçok etken taş oluşumunun başlangıcı olan süpersaturasyona sebep olabilmektedir. Süpersaturasyon sonrası inhibitörlerin etkisinin de azalmasıyla nükleasyon ve daha sonra da kristalizasyon gerçekleşir. Kristallerin agregasyonu ile ve idrar retansiyonunun katkısıyla taş oluşumu tamamlanmış olur (11).

Kalsiyum taşları için idrarda kalsiyum, oksalat, ve ürik asit seviyesinin artması taş oluşumunu kolaylaştırırken, sitrat artışı inhibe eder. Ürik asit taşı için artmış pürin alımı ve hiperürikozüri riski artırırken, sistin taşı için sistinüri riski

artırmaktadır. Yine ürik asit taşı için pH düşüklüğü kolaylaştırıcı faktörken, enfeksiyon taşları için pH'nın yüksek olması taş oluşumunu kolaylaştırır (11).

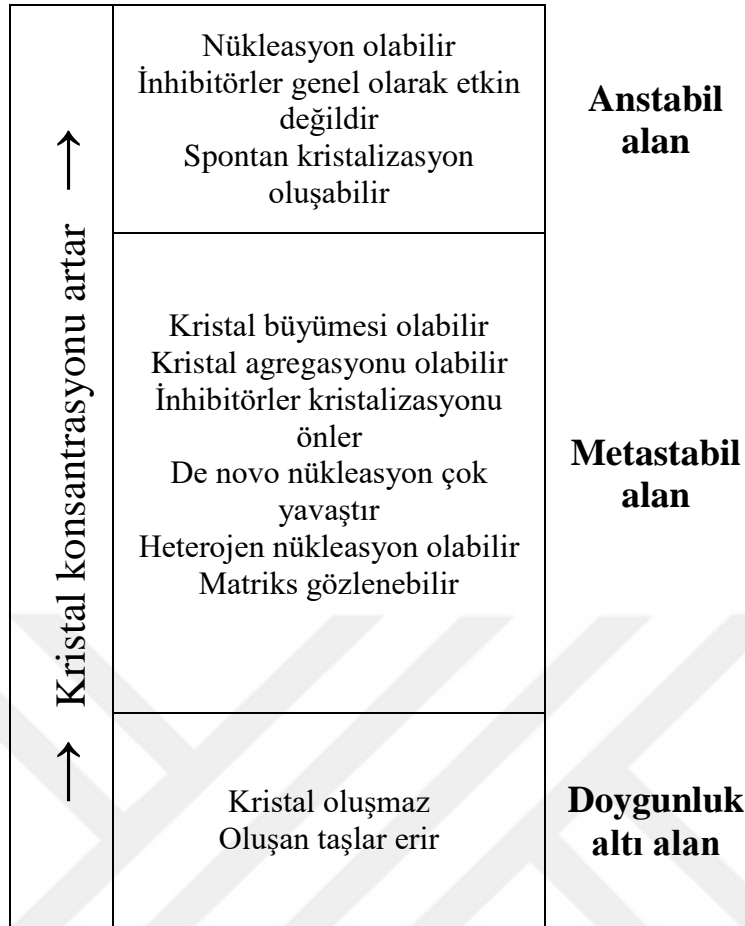
2.3.1. Taş Oluşum Aşamaları

2.3.1.1. Süpersaturasyon

İdrarda çözülmüş halde bulunan tuzların konsantrasyonlarının çözünemeyecek kadar yüksek olmasına süpersaturasyon denir. Süpersaturasyon değerleri taşın tipine, kişiye göre değişkenlik göstermektedir. Tuzların konsantrasyonlarının çözünürlüklerine oranı süpersaturasyon değeridir. Bu değer 1'e yaklaştıkça doygunluk artarken, 1'i geçtiğinde artık kristalizasyon kendiliğinden oluşabilmektedir (11). pH değişimi, inhibitör varlığı gibi etkenler 1'in üzerindeki değerlerde taş oluşumunu önleyemeyebilir. Bu durumda kristalizasyon kaçınılmaz olur. pH değişiminin fostat gibi üretimi pH' a bağlı iyonların konsantrasyonları üzerinde etkisi büyük iken, oksalat konsantrasyonunun üzerinde pek etkisi yoktur (9).

2.3.1.2. Nükleasyon

Normalde idrarda kalsiyum oksalat çözünürlüğü sudakinin dört katıdır. İnhibitörler sayesinde kalsiyum oksalat kristallerinin çökmesi süpersaturasyon değerinin 7-11 katı konsantrasyonda meydana gelir. Oluşan çekirdekler kararsız yapıdadırlar. Belli bir boyutun üstündeki çekirdekler çözünmek yerine büyümeye başlar. Süpersaturasyon seviyesi, çekirdek stabilitesi uygunsa ve idrarın nefronlardan geçiş hızı düşükse çekirdekler kalıcı hale gelir (9).



Şekil 1: Kristal konsantrasyonlarına göre saturasyon bölgeleri (9)

2.3.1.3. Kristalizasyon, Agregasyon ve Retansiyon

İdrarda süpersaturasyonun devamı ve inhibitör etkisinin azalması ile kristalizasyon sürekli hale gelir. Aynı veya farklı tipte kristaller birbirine yapışarak büyüebilmektedir. Bu yapışma aynı tipte olanlar arasında ise homojen, farklı tipte ise heterojen olarak isimlendirilir. Ürik asit kristalleri kalsiyum oksalat kristalleri ile birleşebilirken, sistin kristalleri başka moleküllerle birleşmez (14). Normalde idrarın nefronlardan mesaneye kadar olan geçişi 5-7 dakika sürmektedir. Retansiyon gelişimi ile kristallerin büyümesi hızlanır. Kristal retansiyonunu açıklayan iki teori mevcuttur (11).

- ❖ **Sabit partikül teorisi:** Kristaller oluşuktan sonra renal tübüler epitel hücrelerine bağlanarak buradan orijin alırlar. Çalışmalarda sıçan renal tübüler epitel hücrelerinden izole edilen membranöz

veziküllerin kalsiyum oksalat nükleasyonunu indüklediği gösterilmiştir (16).

- ❖ **Serbest partikül teorisi:** Oluşan kristaller tübüllerden geçerken büyüklüğü nedeniyle retansiyona neden olurlar. Histolojik incelemelerde toplayıcı tübülleri tıkayan kristallerin gözlenmesiyle bu teori ispatlanmıştır (9).

2.3.2. Kristal Oluşumunda İnhibitör ve Promoter Faktörler

Üriner sistemde oluşan taşın tipine göre inhibitör ve promoter faktörler bulunmaktadır. Kalsiyumun oksalatla veya fosfat ile kristalizasyonunu önleyen inhibitörler varken ürik asitin kristalizasyonunu önleyen bir inhibitör yoktur. İdrarda kalsiyumun fosfat ile kristalizasyonunu önleyen inhibitör aktivitenin yarısını pirofosfat sağlamaktadır (9). Kalsiyum taşı oluşumunda en önemli inhibitör sitrattır (14). Sitrata oksalat ve fosfatın yerine iyonize kalsiyumla birleşerek süpersaturasyonu önler. Magnezyum ise oksalat ile birleşerek kalsiyum oksalat taşı oluşumunu önlemektedir. Pirofosfat, fosfat ve magnezyum ayrıca oluşan kristallerin büyümesini de inhibe etmektedir (9).

İdrarda bulunan glikozaminoglikanlar, mukopolisakkaritler ve hatta RNA (ribonükleik asit) kristallerin nükleasyonu ve büyümesini inhibe etmektedir. Glikozaminoglikanlardan heparin sülfatın kalsiyum oksalat monohidrat kristallerini çok güçlü şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. İdrardaki glikoproteinlerden nefrokalsin ve Tamm-Horsfall proteinleri de kalsiyum oksalat monohidrat agregasyonunu inhibe eder. Diğer adı üromodulin olan, idrarda en çok bulunan protein Tamm-Horsfall proteini agregasyonu inhibe ederken, kristal büyümesini etkilememektedir. Bir diğer glikoprotein osteopontinin ise kalsiyum oksalatın nükleasyonu, büyümesi, agregasyonunu ve epitel hücrelerine adezyonunu inhibe ettiği in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (9).

Üriner sistem taşlarının yapısında kristal olan ve olmayan bileşenler bulunur. Kristal olmayan kısmına matriks denir. Heterojen bir yapıya sahip olan matriks %65 protein, %9 şeker, %5 glikozamin, %10 sudan oluşmaktadır. Protein kısmında nefrokalsin, Tamm-Horsfall proteini, renal litostatin, albümin, glikozaminoglikanlar, mukoproteinler bulunmaktadır (14).

Tablo 1: Taş oluşumunu etkileyen inhibitör ve promoterler (14)

Sitrat
Tamm-Horsfall protein
Magnezyum
Albümin
Nefrokalsin
Pirofosfat
Osteopontin
Glukozaminoglikanlar
Litostatin
Enflamatuvar proteinler

Tablo 2: Üriner sistem taşlarının tipi ve özellikleri (11)

Taşın Tipi	Sıklığı	Bileşimi	Radyografi	Promoter Faktörler
Kalsiyum taşı	%82	Kalsiyum, oksalat, fosfat	Opak	Hiperkalsiüri, hipositratüri, hiperoksalüri
Ürik asit taşı	%7	Ürik asit	Nonopak	Düşük pH, hiperürikozüri, aşırı pürin alımı
Struvit taşı	%7	Magnezyum, amonyum, fosfat	Semiopak	Enfeksiyon, yüksek pH
Sistin taşı	% 1-3	Sistin	Semiopak	Sistinüri
Diğer taşlar	<% 1	Ksantin, amonyum urat, ilaç taşları	Nonopak	Antiviral ilaç kullanımı

2.4. Taş Oluşumunu Önleme ve Tedavi Yöntemleri

Üriner sistem taşlarının oluşumunu önlemenin temelinde yaşam tarzı değişiklikleri, beslenme ve ilaçlar yer almaktadır (17). Diyet ve ilaçlar kişinin mevcut olabilecek metabolik hastalığına ve incelenen taşın içeriğine uygun şekilde kişiselleştirilmelidir (18). Genel öneriler arasında sıvı alımının günlük en az 2,5-3 litre, idrar çıkışının ise 2 litre olması, alınan sıvının nötr pH'ya sahip olması ve alımın gün içine yayılması vardır (11). Sebze ve lif ağırlıklı, hayvansal protein ve özellikle kola gibi fosforik asitle asitlendirilen gazlı içeceklerin kısıtlandığı bir diyet nüks ihtimalini azaltmaktadır (17). Günde 4-5 gram ile tuz kısıtlaması önerilirken, ciddi kalsiyum kısıtlaması barsakta kalsiyum ile oksalatın bağlanıp atılmasını azaltıp, emilen oksalatı artırdığından önerilmemektedir. Çikolata, fındık, çay, patates gibi oksalattan zengin gıdaların aşırı tüketimi ve gereksiz C vitamini takviyesi idrarla oksalat atılımını artırdığından diyetle alıma dikkat edilmelidir (11). Portakal, limon, greyfurt, kavun gibi meyveler doğal sitrat kaynağıdır ve idrar sitrat oranını artırabilirler (18).

Tiyazid diüretikleri (klortalidon, hidroklorotiyazid, indapamid), allopurinol, sitrat bileşikleri, potasyum bikarbonat, bifosfonatlar tekrarlayan taş oluşumundan korunmada kullanılan ilaçlardır (17) (19). Tiyazid diüretikleri idrarla kalsiyum atılımını azaltarak, allopurinol ürik asit oluşumunu azaltarak, sitrat ise pH'yı yükselterek taş oluşumunda profilaksi sağlarlar (2). Sitrat bileşiklerinden daha çok potasyum sitrat tercih edilirken pH'nın 7 civarı olması tercih edilir (19).

Oral kemoliz haricinde üriner sistem taşlarının tedavisinde kullanılan bir başka yöntem de perkütan kemolizdir. Perkütan kemoliz yöntemi 50 yıldır var olan ve artık endoürolojik yöntemlerin gelişmesiyle gözden düşmüştür (11) (20). Trihidroksimetil aminometan, hemiasidrin, sitrik asit (Renacidin[®], Uro-Tainer Suby G[®]) gibi ilaçlar perkütan hemolizde kullanılan ilaçlardır (20).

2.5. *Morus nigra* (Karadut)

Halk arasında karadut olarak bilinen *M. nigra* Güneybatı Asya'da, Avrupa'da ve Akdeniz'de yetiştirilen ve geleneksel tıpta kullanılan bir meyve türüdür (7) (21). Fitokimyasal içeriği antosiyanin, flavonoidler ve fenol bileşikleri yönünden oldukça zengindir (22). Antioksidan ve asit içeriği *Morus alba* ve *rubra*'ya göre *M. nigra*'da çok daha fazladır (23). Korede yapılan birçok çalışmanın verilerinin

değerlendirildiği bir metaanalizde *M. nigra*'nın antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antidiyabetik, antihiperlipidemik, antikanser ve organ koruyucu etkilerinden bahsedilmektedir (7). Çin tıbbında diyabet, anemi ve artrit tedavisinde Türkiye'de de analjezi amaçlı kullanılmıştır (24). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada böbrek dokusunda diyabetin verdiği hasarı önlediği belirtilmiştir (25). Alzheimer hastalığına yönelik bir araştırmada *M. nigra* ektresinin solucanlarda amiloid birikimini azalttığı, antioksidan etkinlik gösterdiği ve solucanların ömrünü uzatabileceği gösterilmiştir (26). Bir başka çalışmada hayvanlarda oluşturulan sepsis sonrası verilen *M. nigra*, inflamasyonu önemli derecede azaltmış, antioksidan etkinlik göstermiştir (27). Hayvanlarda sitriknin ile oluşturulan nöbetlerde antikonvülzan etkinliğinin olduğu gösterilmiştir (28). Çinde yapılan bir çalışmada *M. nigra*'dan izole edilen bir polisakkarit fraksiyonunun, metabolik sendromun nedeni sayılan lipotoksisite üzerinde olumlu etkileri görülmüş ve lipit bozuklukları tedavisinde büyük potansiyele sahip olabileceği ifade edilmiştir (29).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda 8-10 haftalık ortalama 300 ± 25 gr ağırlığında toplam 28 adet erişkin erkek Wistar tipi ratlar kullanıldı. Etik kurul izni alındıktan sonra ratlar Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilerek deneyimiz aynı merkezde gerçekleştirildi. Ratlar laboratuvarında 28 gün boyunca 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde oda sıcaklığında (25°C) ad libitum beslendi. Dört ayrı kafese her grupta yedişer rat olacak şekilde yerleştirildi. Beslenmeleri standart laboratuvar yemi ve suyu ile sağlandı.



Şekil 2: Wistar tipi erişkin ratlar

3.2. Deney Protokolü

Ratlar gruplar arası ağırlık dağılımı birbirine yaklaşık olacak şekilde 28 hayvan 4 gruba ayrıldı.

Tablo 3: Ratların ortalama ağırlıkları

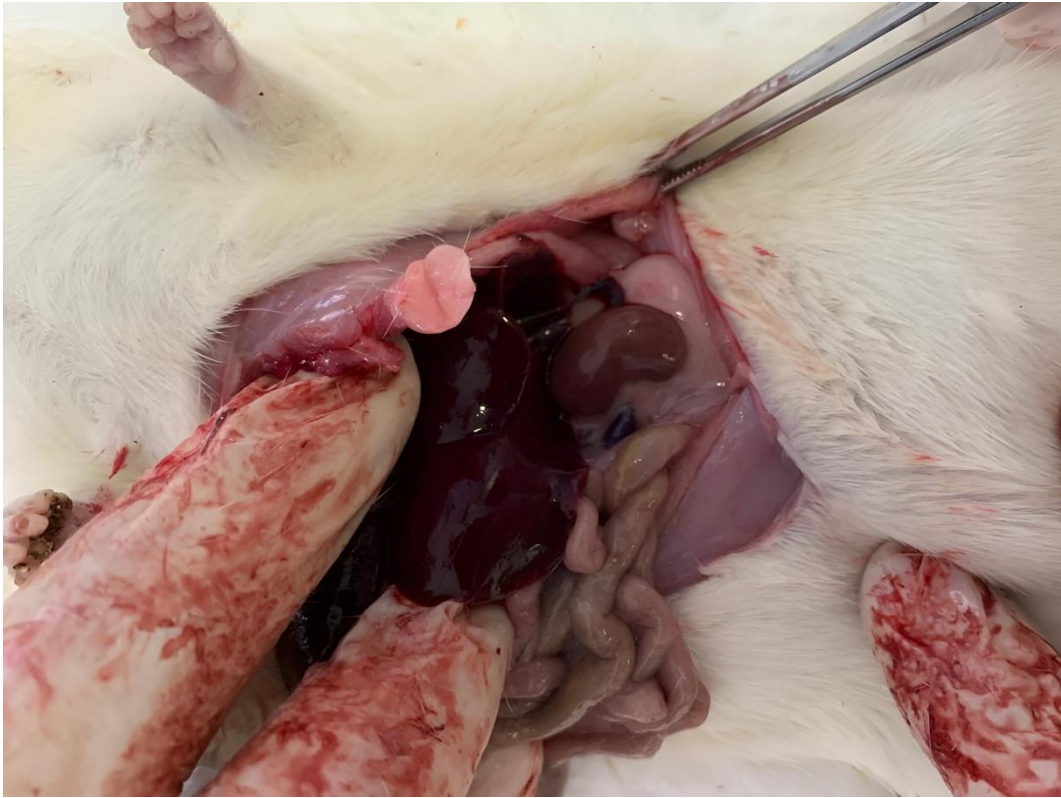
Gruplar	Ortalama rat ağırlıkları
I. Grup	285±35 gr
II. Grup	300±20 gr
III. Grup	290±25 gr
IV. Grup	295±20 gr

- 1. Grup (Kontrol grubu):** Sadece distile su verildi.
- 2. Grup (Etilen Glikol grubu):** Distile su içinde %0,75'lik etilen glikol içeren diyet verildi.
- 3. Grup (Etilen Glikol + Potasyum Sitrat grubu):** Distile su içinde %0,75'lik etilen glikol içeren diyet verildi. 28 gün boyunca rat başına 0,4 mEq/gün potasyum sitrat oral gavaj yoluyla verildi.
- 4. Grup (Etilen glikol + *M. nigra* ekstresi grubu):** Distile su içinde %0,75'lik etilen glikol içeren diyet verildi. 28 gün boyunca rat başına 800 mg/kg/gün *M. nigra* ekstresi oral gavaj yoluyla verildi.

28 günün sonunda ratlar metabolik kafeslere yerleştirilerek 24 saatlik idrarları toplandı. Daha sonra ketamin/ksilazin 80/12 mg/kg dozunda intramüsküler yoldan verilerek sakrifiye edildi. Her bir rattan intrakardiyak 5cc kan örneği sarı kapaklı biyokimya tüpüne alındı. Doku analizi amacıyla bütün ratların her iki böbreği formaldehit dolu kaplara alındı.



Şekil 3: Metabolik kafeslere alınan ratlar



Şekil 4: Sakrifiye edildikten sonra alınan böbrek

❖ Serum elektrolit ve toplam antioksidan seviyelerinin belirlenmesi

Toplanan kan örneklerinden serum elektrolit seviyeleri (Üre, Cr, Na, Ca, Mg, K, Cl) toplam antioksidan kapasite nativ tiyol, total tiyol ve disülfid ölçümleri fotometrik yöntemle üretici firma önerileri doğrultusunda Abbott Architect c8000 (Abbott Diagnostics, IL, Amerika) otoanalizör sisteminde çalışıldı.

❖ İdrar numunelerinin toplanması ve değerlendirilmesi

Ayrı ayrı metabolik kafeslere alınarak toplanan 24 saatlik idrar numunelerinden volüm, pH, total protein, kristal yoğunluğu ve lökosit Sysmex UF-5000, UC-3500, UD-10 (Sysmex Corporation, Kobe, Japonya) modüllerinde tam otomatik idrar analiz cihazı ile çalışıldı.

❖ Histopatolojik inceleme

Böbrekler histopatolojik inceleme ve kalsiyum oksalat kristal yoğunluğunun tespiti için formaldehit dolu kaplara alındıktan sonra hematoksilen-eozin ile boyandı. Daha sonra 4 mikrometre kalınlıkta kesitler alınarak polarize ışık altında incelendi. Ca oksalat kristallerinin en yoğun olduğu beş büyük büyütme alanı dikkate alınarak kristal yoğunlukları değerlendirildi.

❖ İstatiksel Analiz

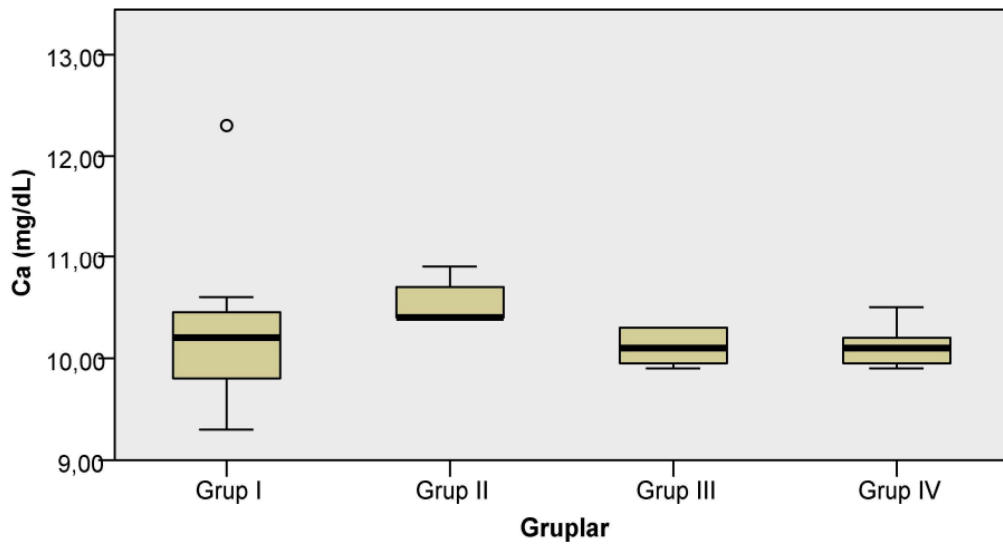
Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilirken verilerin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk testi yapılarak ve skiwness, kurtosis değerleriyle histograma bakılarak yorumlandı. Normal dağılım gösteren veriler One-Way ANOVA ile analiz edilirken, normal dağılmayan veriler Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. P değeri 0,05'ten küçük bulunduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Serum Biyokimyasal Parametrelerin Karşılaştırılması

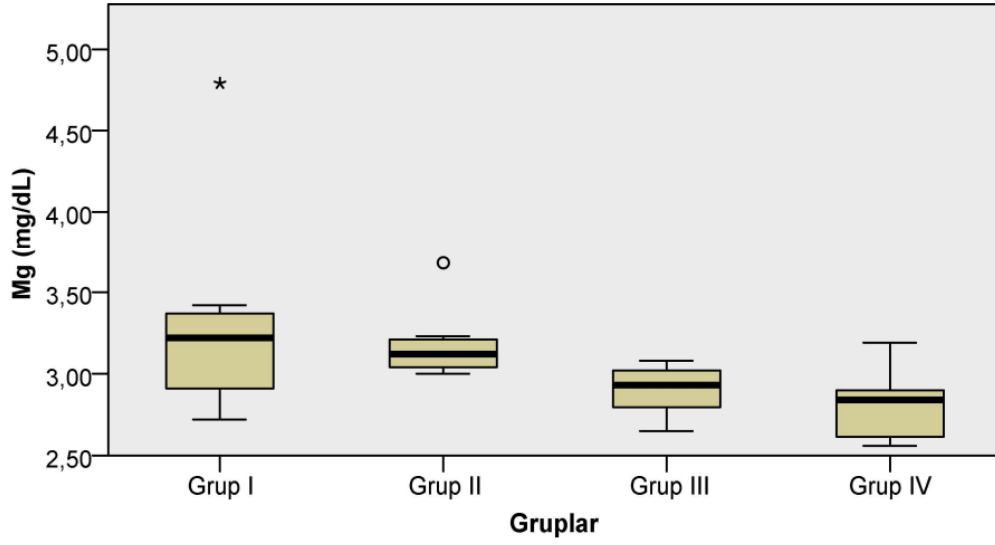
Bakılan serum parametrelerinde gruplar arasında üre, kreatinin, sodyum, klor ve potasyum seviyeleri birbirine yakın değerlerdedi. Dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4).

Grupların serum kalsiyum seviyeleri sırasıyla $10,32\pm 0,97$ mg/dL, $10,55\pm 0,23$ mg/dL, $10,11\pm 0,18$ mg/dL ve $10,11\pm 0,21$ mg/dL olarak bulundu. Grup II serum kalsiyum seviyesi Grup I'e göre istatistiksel anlamlı seviyede daha yüksek bulundu. ($p=0,032$). Grup II serum kalsiyum seviyesi Grup III ve Grup IV'e göre istatistiksel anlamlı seviyede daha yüksek bulundu. (sırasıyla $p=0,007$; $p=0,009$) (Tablo 4, Şekil 5).



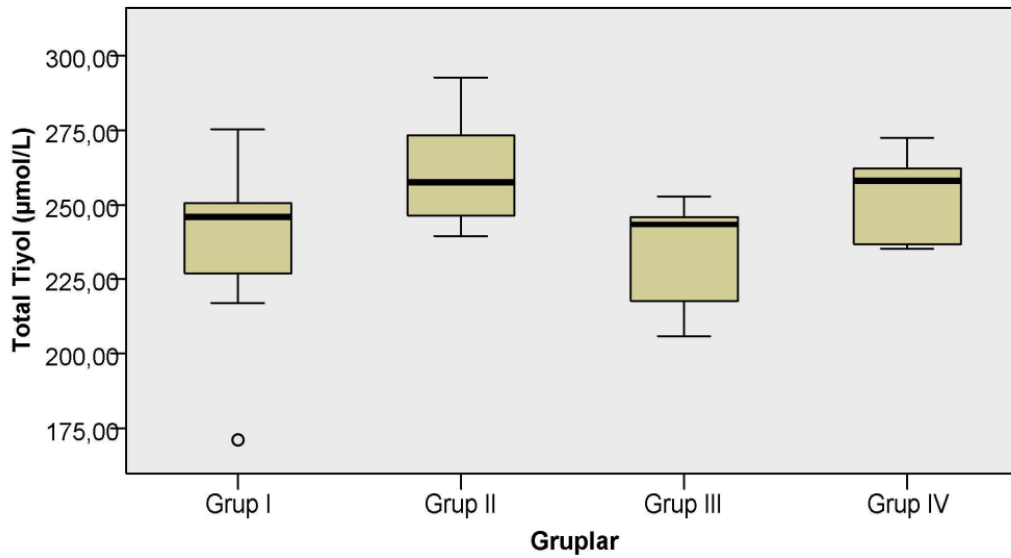
Şekil 5: Serum Ca değerlerinin dağılımı

Grupların serum magnezyum seviyeleri sırasıyla $3,32\pm 0,69$ mg/dL, $3,18\pm 0,23$ mg/dL, $2,89\pm 0,15$ mg/dL ve $2,80\pm 0,22$ mg/dL olarak bulundu. Grup I'de serum magnezyum seviyesi Grup IV'e göre istatistiksel anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p=0,023$). Grup II'de serum magnezyum seviyesi Grup III ve IV'e göre istatistiksel anlamlı derecede daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,041$; $p=0,007$) (Tablo 4, Şekil 6).



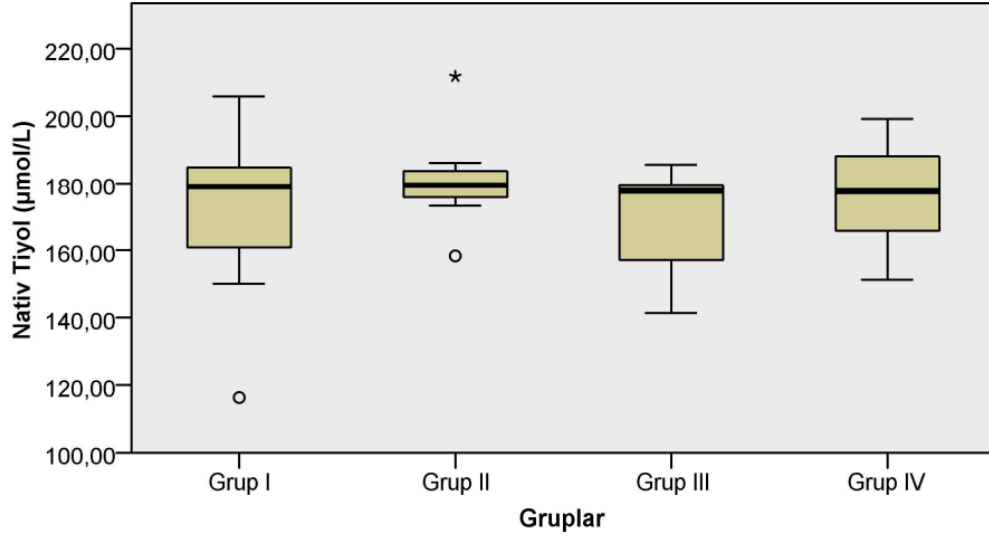
Şekil 6: Serum Mg değerlerinin dağılımı

Grupların serum total tiyol seviyeleri sırasıyla $235,30 \pm 33,27 \mu\text{mol/L}$, $261,24 \pm 21,50 \mu\text{mol/L}$, $232,63 \pm 19,23 \mu\text{mol/L}$ ve $251,87 \pm 15,54 \mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Tablo 4, Şekil 7).



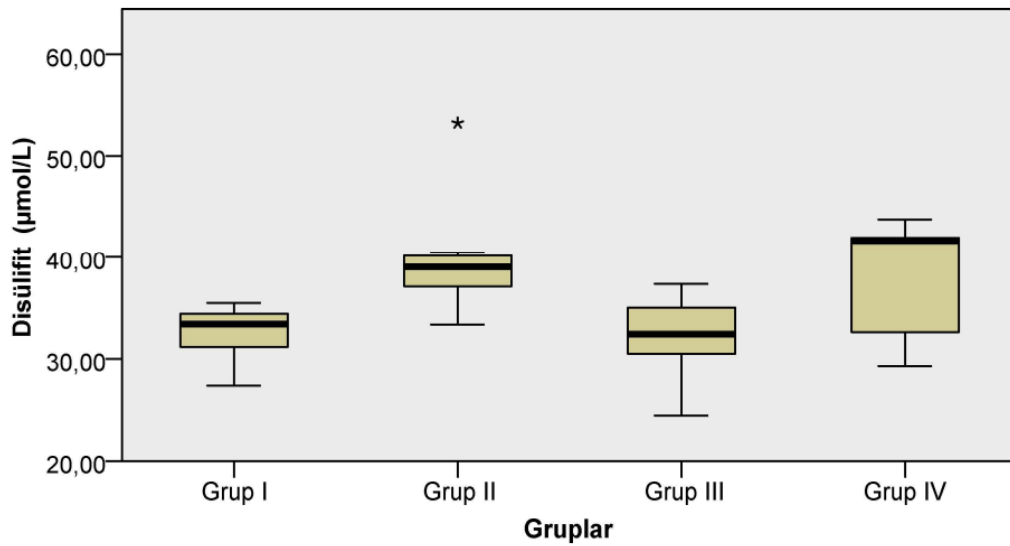
Şekil 7: Serum total tiyol değerlerinin dağılımı

Grupların serum nativ tiyol seviyeleri sırasıyla $170,33 \pm 29,10 \mu\text{mol/L}$, $181,22 \pm 16,11 \mu\text{mol/L}$, $168,28 \pm 18,58 \mu\text{mol/L}$ ve $176,51 \pm 17,81 \mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Tablo 4, Şekil 8).



Şekil 8: Serum nativ tiyol değerlerinin dağılımı

Grupların serum disülfid seviyeleri sırasıyla $32,48 \pm 2,91 \mu\text{mol/L}$, $40 \pm 6,33 \mu\text{mol/L}$, $32,17 \pm 4,48 \mu\text{mol/L}$ ve $37,67 \pm 6,09 \mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. Grup II serum disülfid seviyesi Grup III'e göre istatistiksel anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p=0,04$). Grup IV'te serum disülfid seviyesi Grup II'ye göre istatistiksel anlamlı bir fark olmasa da daha düşük bulundu (Tablo 4, Şekil 9).



Şekil 9: Serum disülfid değerlerinin dağılımı

Tablo 4: Grupların serum parametrelerine göre karşılaştırılması

	I. Grup (Kontrol)	II. Grup (EG)	III. Grup (PS)	IV. Grup (MN)	P
Üre (mg/dL)	54,00±13,39	49,57±4,65	45,29±4,23	45,14±8,21	0,18
Kreatinin (mg/dL)	0,49±0,02	0,49±0,02	0,46±0,03	0,45±0,03	0,07
Sodyum (mmol/L)	138,86±3,13	141,57±1,27	139,43±1,90	141,86±1,86	0,11
Klor (mmol/L)	98,14±1,95	98,57±0,78	99,67±1,50	100,86±1,46	0,27
Potasyum (mmol/L)	5,97±0,22	5,12±0,57	4,95±0,74	4,54±0,47	0,12
Kalsiyum (mg/dL)	10,32±0,97	10,55±0,23	10,11±0,18	10,11±0,21	0,007[#] 0,009^{##} 0,032^{###}
Magnezyum (mg/dL)	3,32±0,69	3,18±0,23	2,89±0,15	2,80±0,22	0,023⁺ 0,007⁺⁺ 0,041⁺⁺⁺
Total Tiyol (µmol/L)	235,30±33,27	261,24±21,50	232,63±19,23	251,87±15,54	0,09
Nativ Tiyol (µmol/L)	170,33±29,10	181,22±16,11	168,28±18,58	176,51±17,81	0,65
Disülfit (µmol/L)	32,48±2,91	40±6,33	32,17±4,48	37,67±6,09	0,04[*]

Kısaltma: EG: Etilen Glikol, PS: Potasyum Sitrat, MN: *M. nigra*. İstatistiksel anlamlı farklar bold işaretlenmiş ve anlamlılığı sağlayan gruplar aşağıda belirtilmiştir.

[#] : Grup II vs Grup III

^{##} : Grup II vs Grup IV

^{###} : Grup II vs Grup I

⁺ : Grup IV vs Grup I

⁺⁺ : Grup II vs Grup IV

⁺⁺⁺ : Grup II vs Grup III

^{*} : Grup II vs Grup III

4.2. İdrar Parametrelerinin Karşılaştırılması

Her gruptan toplanan 24 saatlik idrar hacimlerinin karşılaştırılmasında gruplar arası idrar hacimleri benzerdi.

Grupların idrar pH değerleri sırasıyla $8,6\pm 0,54$, $8,25\pm 0,28$, $8,8\pm 0,27$ ve 9 ± 0 olarak bulundu. Grup IV idrar pH'sı Grup II'ye göre istatistiksel anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p=0,005$). Grup III idrar pH'sı Grup II'ye göre istatistiksel anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p=0,05$). *M. nigra*'da daha fazla olmak üzere potasyum sitrat ve *M. nigra*'nın idrarı alkali hale getirdiği gözlemlendi (Tablo 5).

İdrar protein miktarları bütün gruplarda 2(+) ile 4(+) değerleri arasındaydı. Gruplar arası idrar protein miktarları istatistiksel anlamlı fark oluşturmadı. Grupların idrar parametreleri Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5: Grupların idrar parametrelerine göre karşılaştırılması

	I. Grup (Kontrol)	II. Grup (EG)	III. Grup (PS)	IV. Grup (MN)	p
İdrar hacmi (cc)	12 \pm 2,91	17 \pm 7,48	15 \pm 4,95	12,4 \pm 2,3	0,12
pH	8,6 \pm 0,54	8,25 \pm 0,28	8,8 \pm 0,27	9 \pm 0	0,005^x 0,05^{xx}
Protein	2(2-2)	2(2-2)	2(2-4)	3(2-4)	0,11
Lökosit (n/μL)	4,45(4,1-16,1)	5,5(0,2-95)	5(1,1-23,3)	20(12-41,2)	0,20
Kristal yoğunluğu (n/μL)	126(94-425)	1099(507-1178)	281(142-1433)	289(19-340)	0,007* 0,016**

Kısaltma: EG: Etilen Glikol, PS: Potasyum Sitrat, MN: *M. nigra*, n/ μ L: number/mikrolitre. İstatistiksel anlamlı farklar bold işaretlenmiş ve anlamlılığı sağlayan gruplar aşağıda belirtilmiştir.

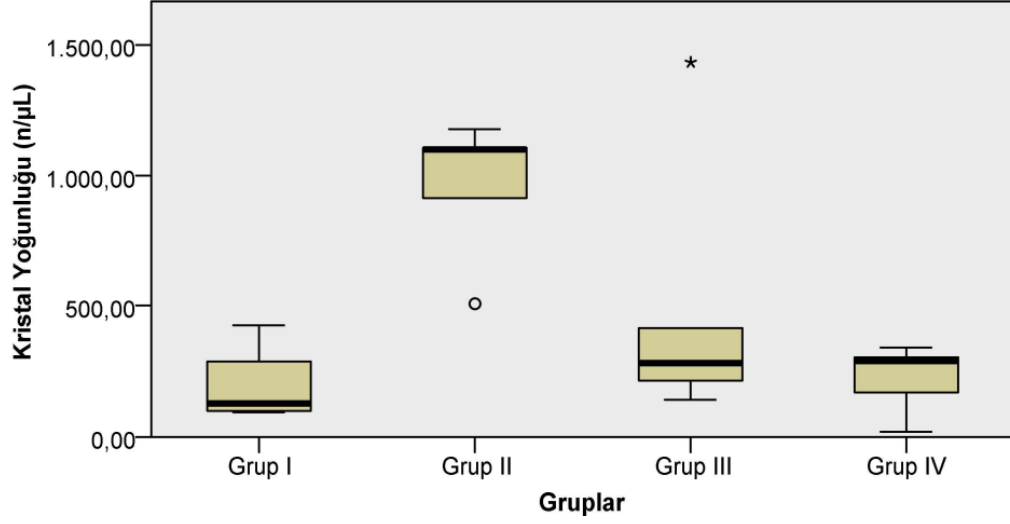
^x : Grup II vs Grup IV

^{xx}: Grup II vsGrup III

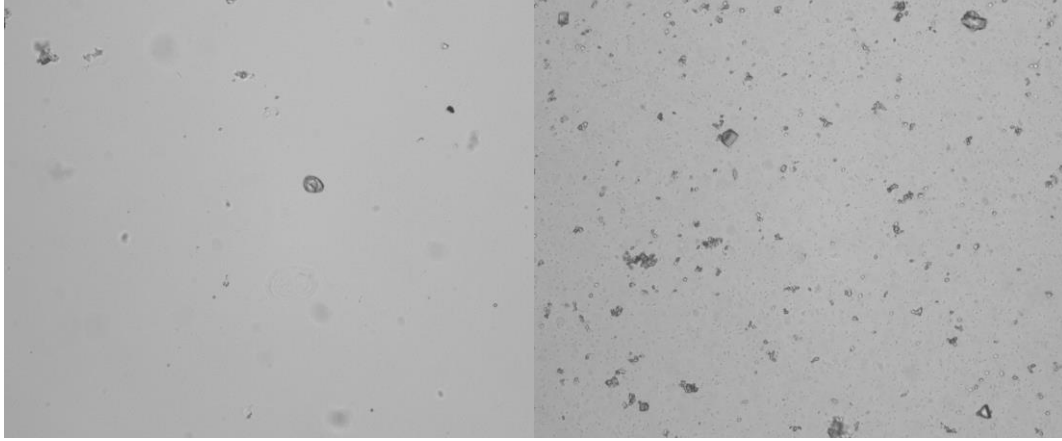
* : Grup I vs Grup II

** : Grup II vs Grup IV

Grupların idrar kristal yoğunluğu sırasıyla [126 (94-425) n/μL], [1099 (507-1178) n/μL], [281 (142-143) n/μL] ve [289 (19-340) n/μL] olarak bulundu. Grup IV idrar kristali Grup II'ye göre istatistiksel anlamlı oranda düşük bulundu ($p=0,016$). Grup I idrar kristali Grup II'ye göre istatistiksel anlamlı oranda düşük bulundu ($p=0,007$) (Tablo 5, Şekil 10).

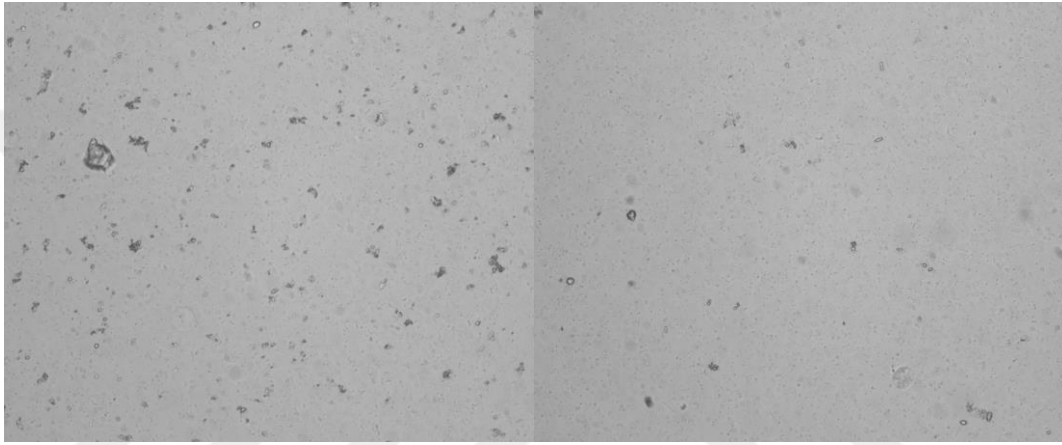


Şekil 10: İdrar kristal yoğunluğu değerlerinin dağılımı



I. Grupta idrar kristalleri

II. Grupta idrar kristalleri



III. Grupta idrar kristalleri

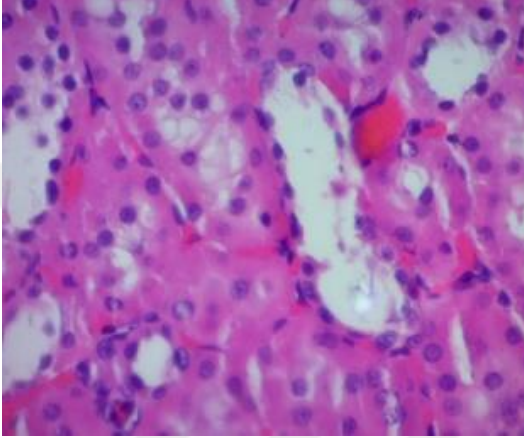
IV. Grupta idrar kristalleri

Şekil 11: Gruplara göre idrar kristali mikroskopik görüntüleri

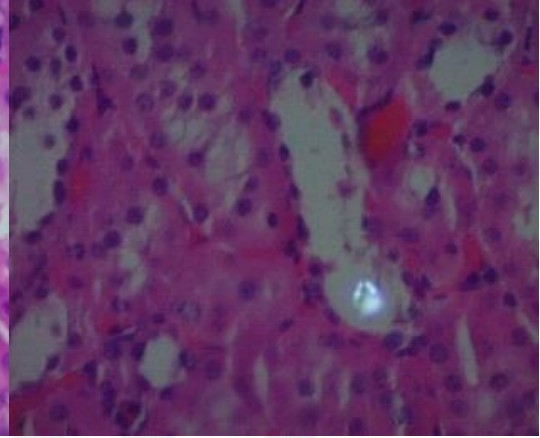
İdrar numunelerinin mikroskopik incelemesinde en fazla kristal Grup II'de ardından Grup 3 ve 4'te, en az kristal ise Grup I'de gözlemlendi (Şekil 11).

4.3. Histopatolojik Parametrelerin Karşılaştırılması

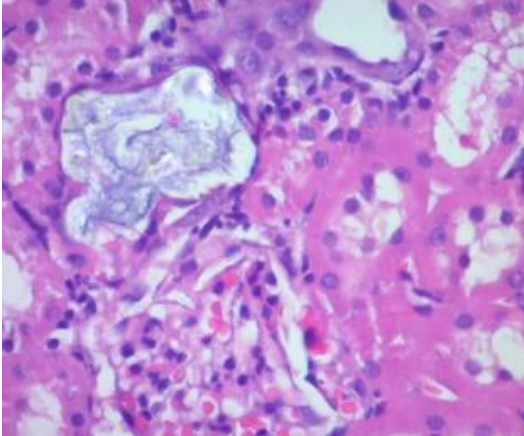
Gruplar histolojik olarak değerlendirilirken böbrek kesitleri standart ışık mikroskobu ve polarize ışık altında incelendi. Kristal yapıları kesitlerde gösterildi. En fazla kristal yoğunluğu Grup II'de gözlemlendi. Histolojik kesitlerde Grup III ve Grup IV'te kristal yoğunluğunun Grup II'ye göre azaldığı gözlemlendi. Grup III'te ise Grup IV'e göre daha az kristal yoğunluğu gözlemlendi (Şekil 12).



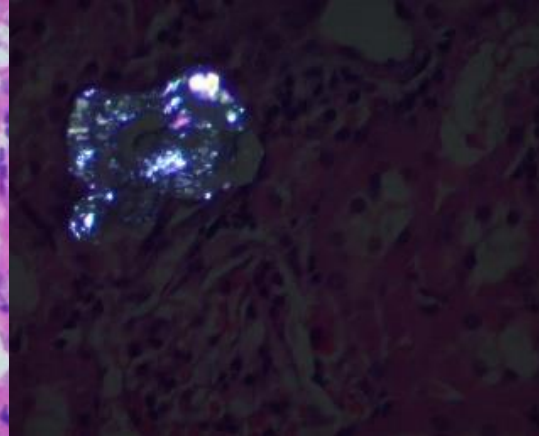
I. Grup Hematoksilen-Eozin boyalı kesit



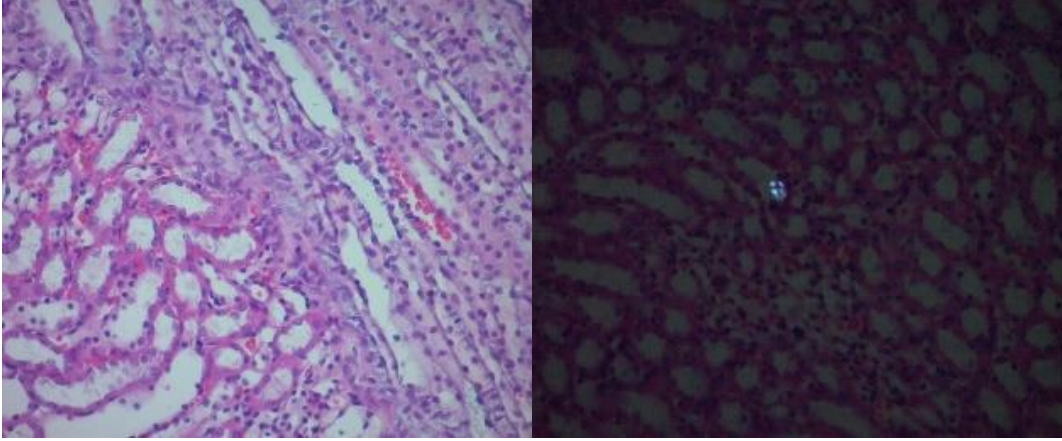
I. Grup polarize ışık altında kesit



II. Grup Hematoksilen-Eozin boyalı kesit

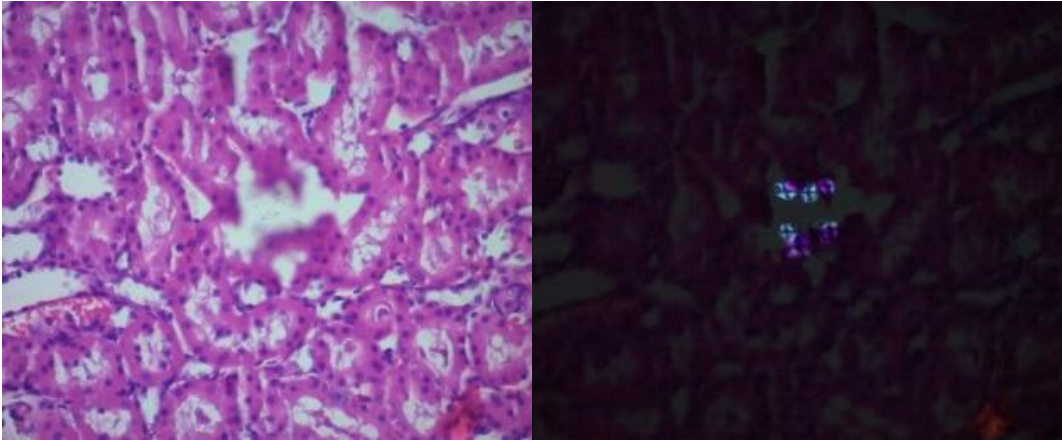


II. Grup polarize ışık altında kesit



III. Grup Hematoksilen-Eozin boyalı kesit

III. Grup polarize ışık altında kesit



IV. Grup Hematoksilen-Eozin boyalı kesit

IV. Grup polarize ışık altında kesit

Şekil 12: Grupların standart ışık mikroskobu ve polarize ışık altında görüntüleri

5. TARTIŞMA

Toplumun önemli bir kısmını etkileyen üriner sistem taş hastalığı önemli bir sağlık sorunudur (1). Maliyet açısından bakıldığında prevalansı ve nüksünün yüksek olması nedeniyle ülkelerin sağlık sistemine büyük maliyeti olmaktadır. Büyük taşlar yatarak ve cerrahi tedavi gerektireceğinden artan nüfusla beraber maliyetlerin düşmesine pek olanak vermemektedir. Bu maliyetleri düşürmenin bir yolu da taş hastalığını önleyebilecek koruyucu hekimlikten geçmektedir (30). Üriner sistem taş hastalığını önlemede fitoterapotik ürünler umut vadetmekte ve bilimsel araştırmalarla desteklenmektedir (31).

Hem tıp dünyasında bilimsel çalışmalarla, hem de toplumda kişisel olarak taş hastalığından korunmak için arayışlar devam etmektedir. Anadolu'da, Uzak Doğu'da, Kuzey Afrika'da, Çin'de ve dünyanın birçok yerinde farklı bitkisel ürünler üriner sistem taşlarının tedavisinde kullanılmaktadır. *Herniaria hirsuta*, *Hygrophila spinosa*, *Cucumis melo*, *Cynodon dactylon*, *Phyllanthus niruri* gibi bitkiler bunlardandır (32) (33). Bu bitkilerin birçoğu araştırmalara konu olmuş ve sonuçlar bilimsel makalelerde yayınlanmıştır. *M. nigra*'nın farmakolojik etkileri *M. alba*'ya göre daha az çalışılmıştır. Ama yine de *M. nigra*'dan izole edilen bazı biyoaktif bileşikler antioksidan ve analjezik etkileri sayesinde ilaç olarak kullanılmaktadır (27).

Hayvanlarda deneysel olarak böbrek taşı oluşturmanın birçok yöntemi vardır. Etilen glikol, amonyum oksalat, amonyum klorür, sodyum oksalat, hidroksi-L-prolin gibi kimyasallar tek başına veya kombine kullanılarak deneysel böbrek taşı oluşturmak için verilen ajanlardır. Etilen glikolün yanında amonyum klorür verilmesi veya magnezyum azaltılmış diyet ile beslenmesi taş oluşumunu hızlandırır (34).

Herniaria hirsuta'nın deneysel nefrolitiazise etkisini araştıran bir çalışmada *H. hirsuta* grubunda böbrek histolojisinde ve idrar incelemesinde daha az kalsiyum oksalat kristali gözlenmiştir (35). Freitas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Phyllanthus niruri*'nin idrarda magnezyum ve sitrat atılımını değiştirmemesine rağmen kalsiyum oksalat kristallerinin büyümesini önlediği belirtilmiştir (36). Bir başka çalışmada etilen glikolle oluşturulan nefrolitiaziste

Cynodon dactylon'un metanolik ekstresinin, incelenen histolojik kesitlerde böbrek renal tübüllerinde kalsiyum oksalat kristallerini azalttığı gözlenmiştir (37).

Bizim çalışmamızda da literatürdeki örnek çalışmalara benzer şekilde böbrek renal tübüllerinin histokimyasal incelemesinde etilen glikol grubu kesitlerinde yoğun kristal birikimi gözlenmiştir. Potasyum sitrat grubu ve *M. nigra* grubu kesitlerinde görsel olarak kristal birikiminin oldukça azaldığı, kontrol grubu kesitlerine yaklaştığı gözlenmiştir.

Hindistan'da yapılan kalsiyum oksalat kristal oluşumunun in vitro incelendiği bir çalışmada *Kalanchoe pinnata*, *Emblica officinalis*, *Bambusa nutans* ve *Cynodon dactylon* bitkilerinin etil asetat fraksiyonları, kristal oluşumunu 120 dakikada sırasıyla %67, %92, %86 ve %70 oranlarında engellemiştir (38).

Singh ve arkadaşlarının taş hastaları üzerinde yaptığı potasyum sitrat ile lupeol bazlı bitkisel bir ekstre olan Calcury™'nin karşılaştırıldığı çalışmada; 90 günün sonunda iki grupta da serum sodyum, potasyum, kalsiyum seviyelerinde anlamlı fark bulunamamıştır. Her iki grupta serum ürik asit seviyesinde anlamlı bir düşüş gözlenmiş, idrar pH'sı sadece potasyum sitrat grubunda yükselmiştir. İdrar oksalat değerleri iki grupta da anlamlı oranda azalmış, idrar sitrat seviyeleri anlamlı oranda artmıştır. Röntgen ile taş boyutlarının değerlendirildiği bu çalışmada hem potasyum sitratın hemde bitkisel ekstrenin böbrek taşlarını küçültebileceği belirtilmiştir (39).

M. nigra'nın içerdiği antosiyanin ve flavonoidler sayesinde antiinflamatuvar ve antioksidan etkinliğe sahip olduğu Lucio ve arkadaşlarının yaptığı hayvanlar üzerinde sepsis modeli çalışmasında gösterilmiştir (27). Alloksan ile indüklenen sıçanlarda diyabetik nefropatinin seyrinin araştırıldığı bir çalışmada 8 hafta boyunca 800 mg/kg *M. nigra* ekstresi verilen grupta daha az glomerüler hasarın olduğu, böbrek fonksiyonlarını önemli ölçüde iyileştirdiği tespit edilmiştir (7).

M. nigra ekstresinin antimikrobiyal etkinliği üzerine yapılan, penisilin, streptomisin, siprofiloksasin, ampisilin ve tetrasiklin gibi antibiyotikler ile karşılaştırıldığı bir çalışmada *M. nigra* ekstresinin antibiyotiklerden daha az inhibisyon zonuna rağmen antibiyotik spektrumu açısından daha geniş etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (40). *M. nigra*'nın antimikrobiyal etkinliğinin olması; kalsiyum oksalat taşlarının yanında enfeksiyon taşlarının profilaksisinde de

kullanılabileceği yönünde umut vadetmektedir. Konuyla ilgili literatürde yeterli çalışma olmadığından daha fazla bilimsel araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bilimsel temelde hangi mineralden oluşursa oluşsun taş oluşumunu önlemede birincil amaç idrar süpersaturasyonunu önlemektir (41). Bunun ardından idrar sitrat düzeyini artırmak ve taş oluşturan metabolitleri idrarda azaltmak diğer amaçlar arasında sayılabilir. Güncel çalışmalar taş oluşumunda serbet oksijen radikallerinin ve antioksidan dengesinin rol oynadığını göstermektedir (42). Artmış oksidatif stresin taş oluşumunda rol oynayabileceği belirtilmektedir (43). Oksidan-antioksidan dengesinin önemli bir göstergesi de tiyol gruplarıdır. Tiyoller antioksidan döngüde merkezi ve önemli role sahiptirler (44). Tiyoller içerdiği sülfhidril (-SH) bağları ile reaktif oksidanlarla reaksiyona girerler ve dokuyu oksidasyondan korurlar. Reaksiyon sonucunda disülfid bağları ortaya çıkar (42) (45). Tiyol-disülfid dengesinin disülfid lehine bozulması oksidatif stresin yüksek olduğunu göstermektedir. Oksidatif stresin azalması durumunda disülfid tekrar tiyole indirgenerek tiyol-disülfid dengesi korunmuş olur (46).

Sönmez ve arkadaşlarının taş hastalığının tiyol-disülfid dengesi ile ilişkisini araştırdığı çalışmada kalsiyum oksalat taşı olan hastalarla kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Taş hastası grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha düşük total tiyol ve nativ tiyol, daha yüksek disülfid değerleri bulunmuştur (42).

Çalışmamızda *M. nigra*'nın literatürdeki çalışmalara benzer şekilde antioksidan etkinlik gösterdiği ve disülfid seviyelerini düşürdüğünü gözlemledik. Fakat çalışmamızda Sönmez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak *M. nigra*'nın serum total tiyol ve nativ tiyol değerlerinde bir farklılık oluşturmadığını tespit ettik.

Tungsanga ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada taş hastalarında 1 aylık potasyum sitrat tedavisi sonrası idrar sitrat düzeyi artmış ve oksidatif stres azalmış olmasına rağmen böbrek tübüler hasarında gerileme olmamıştır (47). Biz de aynı şekilde çalışmamızda potasyum sitrat alan grupta oksidatif stresin önemli ölçüde azaldığını gözlemledik.

Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Angelica sinensis* köklerinden elde edilen bir polisakkaritin, potasyum sitrat ile karşılaştırılarak ratlarda oluşturulan deneysel nefrolitiaziste koruyucu olup olmadığı araştırılmıştır. Yüksek doz *Angelica sinensis* alan grupta daha fazla olmak üzere etilen glikol grubuna göre istatistiksel anlamlı seviyede idrar kristal miktarı azalmıştır. Antioksidan göstergelerden süperoksit dismutaz ve katalaz etilen glikol grubunda kontrol grubuna göre azalmış, *Angelica sinensis* 'in her iki dozunda da etilen glikol grubuna göre önemli ölçüde artmış ama istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. İdrar sitrat miktarı potasyum sitrat grubunda artarken *Angelica sinensis* gruplarında değişiklik olmamıştır (48).

Rathoda ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sıçanlarda deneysel nefrolitiaziste, taş hastalığı tedavisinde yeri olan Cystone® ile nar suyunun kloroform ve metanol ekstreleri farklı dozlarda karşılaştırılmıştır. İdrar kalsiyum ve oksalat kristali atılımı etilen glikol grubuna göre nar suyunun her iki ekstresinin bütün dozlarında istatistiksel anlamlı seviyede azalmıştır. Nar suyunun kloroform ve metanol ekstrelerinin 400 mg/kg dozlarında verildiği gruplarda idrar kalsiyum ve kristal atılımı Cystone® verilen gruba benzer seviyede düşmüştür.

Bizim çalışmamızda da Wang ve Rathoda'nın çalışmalarıyla uyumlu şekilde *M. nigra* ve potasyum sitratın idrar kristal atılımını azalttığı hem idrar mikroskopisinde hemde histolojik kesitlerde gözlemlendi.

İdrar kristal seviyelerindeki bu düşüşün muhtemel nedeni *M. nigra* 'nın antioksidan ve antiinflamatuvar etkinliğidir. Ma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada eritrositlerdeki oksidatif stresin renal hücre tübüllerinde hasar ve kalsiyum kristalizasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (43). Gökner ve arkadaşlarının pediatrik hastalarda yaptığı çalışmada da oksidatif stresin taş oluşumu patogeneğinde rol oynadığı belirtilmiştir (49). Khan'ın yaptığı bir çalışmada kristalizasyonda rol oynayan Randall plaklarının, reaktif oksijen radikallerinin hasar verdiği böbrek epiteline idrar teması sonrası gelişebileceği belirtilmektedir. NHANES III'te yayınlanan 17.000'den fazla kişinin katıldığı bir çalışmada böbrek taşı hastalarında antioksidan seviyeleri önemli oranda daha düşük bulunmuştur (50).

Tuğcu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada etilen glikolle indüklenen nefrolitiazisli sıçanlarda nar suyunun etkilerine bakılmıştır. 45 günün sonunda etilen glikol grubunda oksidatif stresin göstergesi olan malondialdehit seviyesinde ve idrar oksalat atılımında artış gözlenmiştir. Antioksidan etkili glutatyon ise etilen glikol grubunda azalmıştır. İdrar pH seviyeleri etilen glikol grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı seviyede daha yüksek bulunmuştur (51).

Bizim çalışmamızda ise Tuğcu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak idrar pH'sı etilen glikol grubunda kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur.

İdrar pH artışı kalsiyum taşlarında, ürik asit ve sistin taşlarının tedavisinde sistemik alkalizasyon takibi için önemlidir. Alkalizasyonu sağlamak için kullanılan potasyum sitrat böbrek distal tübülündeki TRPV5 kanallarını etkileyerek etkisini göstermektedir (52). pH duyarlı olan TRPV5 kanalları ortamın alkali olması durumunda kalsiyum emilimini artırarak idrar kalsiyum atılımının azalmasını sağlamaktadır (53).

Günümüzde taş hastalığı tedavisinde ve profilaksisinde kitaplarda yerini alan potasyum sitrat çalışmamızda belirtildiği üzere idrar pH'sını yükseltmiştir. Çalışmamızda *M. nigra* potasyum sitrattan daha fazla idrar alkalizasyonu sağladığı için taş hastalığı profilaksisinde umut vadeci görünmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma *M. nigra*'nın hem antioksidan etkisi hem de idrar alkalizan etkisi sayesinde sadece kalsiyum taşlarında değil, aynı zamanda idrar alkalizasyonu gerektiren ürik asit ve sistin taşlarının tedavisinde ve profilaksisinde de kullanılabileceğini göstermektedir. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar *M. nigra*'nın antimikrobiyal etkisi sayesinde enfeksiyon taşlarının profilaksisinde de kullanılabileceği yönünde fikir vermektedir.

Etik ve maliyet gibi nedenlerle gruplarda kullanılan rat sayısının kısıtlı olması, *M. nigra*'nın farklı dozlarda ve daha uzun sürelerde etkisinin araştırılamaması, yine maliyet sorunları nedeniyle oksidan-antioksidan dengenin tespiti için kullanılan diğer biyokimyasal tahlillerin, immünohistokimyasal boyama yöntemleri ve gen analizlerinin yapılamamış olması çalışmamızın kısıtlılıklarını oluşturmaktadır.

Bilgilerimiz ışığında bugüne kadar *M. nigra*'nın böbrek taşlarına karşı koruyucu etkisi ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamız bu kapsamda literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu çalışmada ulaşılan sonuçların daha fazla hayvan ve insan çalışmalarıyla desteklenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKÇA

1. Daga A, Majmundar AJ, Braun DA, Gee HY, Lawson JA, Shril S, et al. Whole exome sequencing frequently detects a monogenic cause in early onset nephrolithiasis and nephrocalcinosis. *Kidney Int.* 2018;93(1):204-13.
2. Moe OW. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet.* 2006;367(9507):333-44.
3. Wang Z, Bai Y, Wang J, Wang J. The preventive and therapeutic effects of α -lipoic acid on ethylene glycol-induced calcium oxalate deposition in rats. *Int Urol Nephrol.* 2020;52(7):1227-34.
4. Pearle MS, Calhoun EA, Curhan GC. Urologic diseases in America project: urolithiasis. *J Urol.* 2005;173(3):848-57.
5. Krieger NS, Asplin JR, Frick KK, Granja I, Culbertson CD, Ng A, et al. Effect of Potassium Citrate on Calcium Phosphate Stones in a Model of Hypercalciuria. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(12):3001-8.
6. Lulat SI, Yadav YC, Balaraman R, Maheshwari R. Antiurolithiatic effect of lithocare against ethylene glycol-induced urolithiasis in Wistar rats. *Indian J Pharmacol.* 2016;48(1):78-82.
7. Lim SH, Choi CI. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. *Nutrients.* 2019;11(2).
8. Lev E, Dolev E. Use of natural substances in the treatment of renal stones and other urinary disorders in the medieval Levant. *Am J Nephrol.* 2002;22(2-3):172-9.
9. Pearle M. S., Antonelli J. A., Lotan Y. *Campbell-Walsh Urology 12th ed Urinary Lithiasis: Etiology, Epidemiology, and Pathogenesis*, Alan W. Partin Roger R. Dmochowski Louis R. Kavoussi Craig A. Peters . Philadelphia: Saunders Elsevier 2021 s: 2005-2035.
10. Mayans L. Nephrolithiasis. *Prim Care.* 2019;46(2):203-12.
11. Kadioğlu A, Yaman Ö., Taşçı İ.A. Güncel Üroloji, 2. Baskı,2018; Türk Üroloji Akademisi, Taş Oluşum Mekanizmaları s: 681-690.
12. Ziembra JB, Matlaga BR. Epidemiology and economics of nephrolithiasis. *Investig Clin Urol.* 2017;58(5):299-306.
13. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(10):1568-73.
14. Özden E. Ürolojik Cerrahi Kitabı 2020, Üriner Sistem Taş Hastalığı Doğan H.S. ÜCD s:479-654.
15. Scales CD, Jr., Smith AC, Hanley JM, Saigal CS. Prevalence of kidney stones in the United States. *Eur Urol.* 2012;62(1):160-5.
16. Khan SR. Heterogeneous nucleation of calcium oxalate crystals in mammalian urine. *Scanning Microsc.* 1995;9(2):597-614; discussion -6.
17. Fontenelle LF, Sarti TD. Kidney Stones: Treatment and Prevention. *Am Fam Physician.* 2019;99(8):490-6.
18. Prezioso D, Strazzullo P, Lotti T, Bianchi G, Borghi L, Caione P, et al. Dietary treatment of urinary risk factors for renal stone formation. A review of CLU Working Group. *Arch Ital Urol Androl.* 2015;87(2):105-20.
19. Goldfarb DS. Empiric therapy for kidney stones. *Urolithiasis.* 2019;47(1):107-13.

20. Gonzalez RD, Whiting BM, Canales BK. The history of kidney stone dissolution therapy: 50 years of optimism and frustration with renacidin. *J Endourol.* 2012;26(2):110-8.
21. Diab KA, Fahmy MA, Hassan EM, Hassan ZM, Omara EA, Abdel-Samie NS. Inhibitory activity of black mulberry (*Morus nigra*) extract against testicular, liver and kidney toxicity induced by paracetamol in mice. *Molecular Biology Reports.* 2020;47(3):1733-49.
22. Ghorbani A, Hooshmand S. Protective Effects of *Morus nigra* and Its Phytochemicals against Hepatotoxicity: A Review of Preclinical Studies. *Pharmacology.* 2021;106(5-6):233-43.
23. Gundogdu M, Muradoglu F, Sensoy RIG, Yilmaz H. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae.* 2011;132:37-41.
24. Özgen M, Serçe S, Kaya C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Scientia Horticulturae.* 2009;119(3):275-9.
25. Rahimi-Madiseh M, Naimi A, Heydarian E, Rafieian-Kopaei M. Renal biochemical and histopathological alterations of diabetic rats under treatment with hydro alcoholic *Morus nigra* extract. *J Renal Inj Prev.* 2017;6(1):56-60.
26. Wang E, Wang N, Zou Y, Fahim M, Zhou Y, Yang H, et al. Black mulberry (*Morus nigra*) fruit extract alleviated AD-Like symptoms induced by toxic A β protein in transgenic *Caenorhabditis elegans* via insulin DAF-16 signaling pathway. *Food Research International.* 2022;160:111696.
27. de Pádua Lúcio K, Rabelo ACS, Araújo CM, Brandão GC, de Souza GHB, da Silva RG, et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) in a Model of LPS-Induced Sepsis. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:5048031.
28. Zehra T, Sarfaraz S, Ikram R. Dose dependent anticonvulsant activity of *Morus nigra* in strychnine induced seizures model. *Pak J Pharm Sci.* 2021;34(6):2167-71.
29. Chen W, Lu Y, Hu D, Mo J, Ni J. Black mulberry (*Morus nigra* L.) polysaccharide ameliorates palmitate-induced lipotoxicity in hepatocytes by activating Nrf2 signaling pathway. *Int J Biol Macromol.* 2021;172:394-407.
30. Lotan Y, Buendía Jiménez I, Lenoir-Wijnkoop I, Daudon M, Molinier L, Tack I, et al. Primary prevention of nephrolithiasis is cost-effective for a national healthcare system. *BJU Int.* 2012;110(11 Pt C):E1060-7.
31. Emiliani E, Jara A, Kanashiro AK. Phytotherapy and Herbal Medicines for Kidney Stones. *Curr Drug Targets.* 2021;22(1):22-30.
32. Ingale KG, Thakurdesai PA, Vyawahare NS. Effect of *Hygrophila spinosa* in ethylene glycol induced nephrolithiasis in rats. *Indian J Pharmacol.* 2012;44(5):639-42.
33. Atmani F, Sadki C, Aziz M, Mimouni M, Hacht B. *Cynodon dactylon* extract as a preventive and curative agent in experimentally induced nephrolithiasis. *Urol Res.* 2009;37(2):75-82.
34. Çakır ÖO, Yürük E, Binbay M. Üriner sistem taş hastalığında deneysel modeller. *Endoüroloji Bülteni.* 2014;7:13-7.
35. Atmani F, Slimani Y, Mimouni M, Hacht B. Prophylaxis of calcium oxalate stones by *Herniaria hirsuta* on experimentally induced nephrolithiasis in rats. *BJU Int.* 2003;92(1):137-40.

36. Freitas AM, Schor N, Boim MA. The effect of *Phyllanthus niruri* on urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and other factors associated with renal stone formation. *BJU Int.* 2002;89(9):829-34.
37. Khajavi Rad A, Hadjzadeh MA, Rajaei Z, Mohammadian N, Valiollahi S, Sonei M. The beneficial effect of *cynodon dactylon* fractions on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. *Urol J.* 2011;8(3):179-84.
38. Sohgaurya AK, Bigoniya P, Shrivastava B. In Vitro Antilithiatic Potential of *Kalanchoe pinnata*, *Emblica officinalis*, *Bambusa nutans*, and *Cynodon dactylon*. *J Pharm Bioallied Sci.* 2018;10(2):83-9.
39. Singh I, Bishnoi I, Agarwal V, Bhatt S. Prospective randomized clinical trial comparing phytotherapy with potassium citrate in management of minimal burden (≤ 8 mm) nephrolithiasis. *Urol Ann.* 2011;3(2):75-81.
40. Minhas MA, Begum A, Hamid S, Babar M, Ilyas R, Ali S, et al. Evaluation of Antibiotic and Antioxidant Activity of *Morus nigra* (Black Mulberry) Extracts Against Soil Borne, Food Borne and Clinical Human Pathogens. *Pakistan Journal of Zoology.* 2016;48(5).
41. Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(5):831-41.
42. Sonmez MG, Kozanhan B, Deniz CD, Iyisoy MS, Kilinc MT, Ecer G, et al. Dynamic thiol/disulfide homeostasis as a novel indicator of oxidative stress in patients with urolithiasis. *icu.* 2019;60(4):258-66.
43. Ma MC, Chen YS, Huang HS. Erythrocyte oxidative stress in patients with calcium oxalate stones correlates with stone size and renal tubular damage. *Urology.* 2014;83(2):510.e9-17.
44. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2000;72(2):653S-69S.
45. Cremers CM, Jakob U. Oxidant sensing by reversible disulfide bond formation. *J Biol Chem.* 2013;288(37):26489-96.
46. Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clinical Biochemistry.* 2014;47(18):326-32.
47. Tungsanga K, Sriboonlue P, Futrakul P, Yachantha C, Tosukhowong P. Renal tubular cell damage and oxidative stress in renal stone patients and the effect of potassium citrate treatment. *Urol Res.* 2005;33(1):65-9.
48. Wang S, Li X, Bao J, Chen S. Protective potential of *Angelica sinensis* polysaccharide extract against ethylene glycol-induced calcium oxalate urolithiasis. *Ren Fail.* 2018;40(1):618-27.
49. Gökner N, Oktem F, Arı E, Demir AD, Torun E. Is oxidative stress related to childhood urolithiasis? *Pediatric Nephrology.* 2014;29(8):1381-6.
50. Khan SR. Reactive oxygen species as the molecular modulators of calcium oxalate kidney stone formation: evidence from clinical and experimental investigations. *J Urol.* 2013;189(3):803-11.
51. Tugcu V, Kemahli E, Ozbek E, Arinci YV, Uhri M, Erturkuner P, et al. Protective effect of a potent antioxidant, pomegranate juice, in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. *J Endourol.* 2008;22(12):2723-31.
52. Song Y, Hernandez N, Shoag J, Goldfarb DS, Eisner BH. Potassium citrate decreases urine calcium excretion in patients with hypocitraturic calcium oxalate nephrolithiasis. *Urolithiasis.* 2016;44(2):145-8.

53. Nijenhuis T, Renkema KY, Hoenderop JG, Bindels RJ. Acid-base status determines the renal expression of Ca²⁺ and Mg²⁺ transport proteins. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(3):617-26.

