

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

HAYVAN MODELİNDE,

HİPEROKZALÜRİYE BAĞLI GELİŞEN RENAL TUBÜLER HÜCRE APOPTOZİSİ

ÜZERİNE DEĞİŞİK ANTİOKSİDAN AJANLARIN

ETKİLERİ

**Uzmanlık Tezi
Dr. M. Sakıp ERTURHAN**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kemal SARICA

GAZİANTEP - 2003

**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

HAYVAN MODELİNDE,

HİPEROKZALÜRİYE BAĞLI GELİŞEN RENAL TUBÜLER HÜCRE APOPTOZİSİ

ÜZERİNE DEĞİŞİK ANTİOKSİDAN AJANLARIN

ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. M. Sakıp ERTURHAN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kemal SARICA

GAZIANTEP - 2003

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	IV
KISALTMALAR	V
TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ	VI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek Anatomisi	3
2.1.1. Arter Sistemi.....	4
2.1.2. Ven Sistemi.....	5
2.1.3. Lenfatik Sistem.....	5
2.1.4. Nefronun Yapısı.....	5
2.2. Böbrek Fizyolojisi	6
2.2.1. İdrar Oluşturma Fonksiyonu.....	6
2.2.2. Böbreklerin Endokrin Fonksiyonu.....	6
2.2.3. İdrar Oluşum Mekanizmaları.....	6
2.2.4. Renal Tubüler Hücre Fonksiyonları	7
2.2.4.1. Tubüli Segmentlerinin Absorbsiyon Yetenekleri.....	8
2.2.4.2. Tubülilerden Su ve İyonların Reabsorbsiyon ve Sekresyonu	9
2.3. Üriner Sistem Taş Hastalığı Etiyolojisi	12
2.3.1. Süpersatürasyon – Kristalizasyon Teorisi.....	12
2.3.2. İnhibitör Eksikliği Teorisi.....	13
2.3.3. Matriks – Nükleasyon ve Agregasyon - Epitaksi Teorisi.....	13
2.3.4. Taş Hastalığında Risk Faktörleri.....	14
2.3.5. Okzalat Metabolizması.....	15
2.3.5.1. Pirimer Hiperokzalüri.....	15
2.3.5.2. Artmış Hepatik Dönüşüm.....	16
2.3.5.3. Enterik Hiperokzalüri.....	16

2.3.5.4. İdiyopatik Hiperokzalüri.....	16
2.3.5.5. Hiperokzalürinin Oluşturduğu Renal Hasar.....	17
2.4. Apoptozis.....	17
2.4.1. Apoptozis Evreleri ve Nekrozdaki Farklılıkları.....	18
2.4.2. Apoptozis Patogenezi ile İlgili Teoriler.....	19
2.4.3. Apoptozisin Etkilediği Olaylar.....	20
2.4.4. Apoptozisi Uyaran Faktörler.....	21
2.4.5. Apoptozis Belirleme Metodları.....	22
2.4.6. Apoptotik Belirleyiciler.....	22
2.5. Antioksidan Ajanlar	24
2.5.1. Magnezyum.....	24
2.5.2. Sitrat.....	25
2.5.3. Vitamin E.....	26
2.5.4. Allopurinol.....	27
2.5.5. Verapamil	27
3. MATERYAL – METOD.....	28
3.1. Denekler.....	28
3.2. Anestezi.....	28
3.3. Cerrahi Girişim.....	28
3.4. Takip.....	29
3.5. Çalışma Grupları.....	29
3.6. Patolojik İnceleme.....	30
3.6.1. Işık Mikroskopisi.....	30
3.6.2. Apoptozis Tespiti.....	31
3.6.3. Apoptozis Skoruması	31
3.7. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Işık Mikroskopisi Bulguları.....	32
4.2. Erken Dönem Apoptotik Değişiklikler.....	34
4.3. Geç Dönem Apoptotik Değişiklikler.....	36

5.	TARTIŞMA.....	41
6.	SONUÇ.....	45
7.	ÖZET.....	46
8.	SUMMARY.....	47
9.	KAYNAKLAR.....	48

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım başta tez hocam Prof.Dr.Kemal SARICA olmak üzere Üroloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr.Faruk YAĞCI , Yrd.Doç.Dr. Ahmet ERBAĞCI, Arş.Gör.Dr.Cihanser YURTSEVEN başta olmak üzere tüm mesai arkadaşlarıma ve tez çalışmamda bana yardımlarını esirgemeyen Uzm.Dr. Oğuzkan TOPÇU ve Uzm.Dr.Okan UYSAL 'a şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında değerli katkıları bulunan Patoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr. Kemal BAKIR'a ve beni her zaman destekleyen eşim Dr.Figen ERTURHAN ve tüm aileme teşekkürü borç bilirim.

KISALTMALAR

ADH :	Antidiüretik hormon
ATP :	Adenozin trifosfat
CAMP :	Siklik adenozin monofosfat
CVB :	Koryon villus biyopsisi
EGF :	Epidermal büyüme faktörü
FGF :	Fibroblast büyüme faktörü
GAG :	Glikozaminoglikan
G-CSF :	Granülosit koloni stimülan faktörü
GM-CSF :	Granülosit-monosit koloni stimülan faktörü
GİS :	Gastrointestinal sistem
IL :	İnterlökin
İYE :	İdrar yolu enfeksiyonu
KBY :	Kronik böbrek yetmezliği
M-CSF :	Makrofaj koloni stimülan faktörü
MPF :	Matürasyon uyarıcı faktör
NGF :	Sinir büyüme faktörü
O. r. :	Otozomal resesif
PTH :	Parathormon
RTA :	Renal tubüler asidoz
TNF :	Tümör nekrozis faktör

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1 :** Apoptotik belirleyiciler
- Tablo 2 :** Erken dönem gruplarının dağılımı
- Tablo 3 :** Geç dönem gruplarının dağılımı
- Tablo 4 :** Kristalizasyon skorlaması
- Tablo 5 :** Apoptozis skorlaması
- Tablo 6 :** Erken ve geç dönem kristalizasyon oranları
- Tablo 7 :** Erken dönem apoptotik değişiklikler
- Tablo 8 :** Geç dönem apoptotik değişiklikler

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1 :** Erken dönem kristalizasyon oranlarının gruplara göre dağılımı
- Şekil 2 :** Geç dönem kristalizasyon oranlarının gruplara göre dağılımı
- Şekil 3 :** Erken dönemde gruplara göre ortalama apoptotik indekslerin dağılımı
- Şekil 4 :** Geç dönemde gruplara göre ortalama apoptotik indekslerin dağılımı

RESİM LİSTESİ

- Resim 1 :** Hafif derecede kristalizasyon gözlenen erken dönemde vitamin E uygulanan gruba ait böbrek örneği
- Resim 2 :** Orta derecede kristalizasyon gözlenen erken dönemde allopurinol uygulanan gruba ait böbrek örneği
- Resim 3 :** Şiddetli kristalizasyon gözlenen geç dönemde $Mg(OH)_2$ uygulanan gruba ait böbrek örneği
- Resim 4 :** Minimal apoptotik değişikliklerin gözlendiği erken dönem vitamin E uygulanan gruba ait böbrek örneği
- Resim 5 :** Orta derecede apoptotik değişikliklerin gözlendiği geç dönem vitamin E uygulanan gruba ait böbrek örneği
- Resim 6 :** Şiddetli apoptotik değişikliklerin gözlendiği geç dönem $Mg(OH)_2$ uygulanan gruba ait böbrek örneği

GİRİŞ VE AMAÇ

Üriner sistem taş hastalığı, üriner enfeksiyonlar ve prostat patolojilerinden sonra üriner sistemi en sık etkileyen üçüncü patolojidir. Taş hastalığı, M.Ö. 4800'lü yıllardan beri varlığı bilinen bir hastalıktır. Eski Mısır'dan günümüze gelen mumyalarda saptanan mesane ve böbrek taşları ve yine Hipokrat yeminindeki **“hiçbir hastanın mesanesini kesip taş çıkarmayacağım”** şeklindeki ibare de o çağlarda üriner sistem taş hastalığının varlığına işaret etmektedir (2).

Üriner sistem taş hastalığı oldukça sık nüks eden bir hastalıktır. Nüks vakaların bir kısmında altta yatan anatomik ya da metabolik bir anomali mevcut iken, büyük bir kısmında idiyoPATİK olarak nüks görülmektedir. Yetişkin beyaz erkeklerde ömür boyu taş gelişimi riski %20'dir. Siyah erkeklerde bu risk 1/3 ya da 1/4 oranında daha azdır. Üriner sistem taş hastalığı bir kez geliştikten sonra 5 yıl içinde nüks riski %50'den yüksek olarak bildirilmiştir (2, 4).

Üriner sistem taş hastalığı en sık 30-60 yaş arası grupta görülmekte olup, kadın/erkek oranı 1/3'tür. Kadın idrarında yüksek oranda bulunan sitrat, taş hastalığından koruyucu bir faktör olarak rol oynamaktadır. Çocuklarda ise testosteron nedeniyle henüz karaciğerde endojen okzalit üretimi az olduğundan her iki cinste de eşit oranda görülmektedir (2).

1940'lerden sonra bu şekilde oldukça yüksek oranda nüks eden taş hastalığının gelişimi hakkında fizyolojik gözlem ve araştırmaların sonuçları sunulmaya başlanmış ve özellikle son 25 yıl içerisinde genetik, moleküler biyoloji ve biyoteknolojideki gelişmelere paralel olarak taş hastalığının fizyopatogenezi hakkında oldukça önemli bilgiler edinilmiştir.

Taş hastalığının etiyolojisi konusunda yapılan araştırmalarda sıvı alımı ve beslenme alışkanlıkları ile bağlantılı olarak ; belirli coğrafyalarda (özellikle sıcak iklimde) yaşayanlarda, sürekli terlemeyle sıvı kaybeden ve durağan mesleklerde çalışanlarda sık görüldüğü saptanmıştır. Ancak aynı risk faktörüne sahip kişilerde aynı oranda taş hastalığının görülmemesi de taş hastalığının etiyolojisinin hala karanlık olduğuna işaret etmektedir (2).

Bugün için görülen tüm üriner sistem taşlarının içeriğine bakıldığında en sık rastlanılan taş, kalsiyum okzalat ve kalsiyum okzalat – kalsiyum fosfat mikst taşlarıdır. Yetişkin taşlarının %65-70'i pür kalsiyum – okzalat taşı olmakla birlikte mikst taşların da %80'inde kalsiyum okzalat bulunur. İkinci en sık karşılaşılan taş cinsi magnezyum -amonyum-fosfat taşları ($MgNH_4PO_4$) olmakta ve en az görülen taşlar, ürik asit, sistin, ksantin ve matriks taşları olmaktadır (37).

Yapılan pekçok çalışmada idiyopatik kalsiyum okzalat taşlarının gelişiminde en önemli risk faktörünün hiperokzalüri olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde kalsiyum –okzalat kristallerinin ya da tek başına okzalat iyonlarının renal tubüler epitel hücrelerinde oluşturduğu hasarın üriner taş oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir. Bu hücre hasarına cevap; artmış hücre proliferasyonu, konsantrasyonu ve hücre ölümü şeklinde gelişmektedir. Yapılan ilk çalışmalarda bu hücre ölümünün nekroz şeklinde geliştiği öne sürülmüşken son yıllarda yapılan çalışmalar bunun basit bir hücre nekrozu değil, programlanmış hücre ölümü ile olduğuna işaret etmektedir (23).

Apoptozis kavramı ilk kez 1973'de Kerr tarafından tanımlanmış ve özellikle 1980'den sonra popüler olmaya başlamış ve hemen hemen tüm tıp bilimlerinde araştırma konusu olmuştur. Bugün için apoptozise neden olan tetikleyici faktörler ve apoptozisi gösteren apoptotik belirleyiciler hakkında yoğun olarak çalışmalar sürmektedir (21).

Coğrafi konum ve iklim şartları nedeniyle ülkemizde ve bölgemizde üriner sistem taş hastalığının oldukça yaygın görülmesi nedeniyle bu konu ile ilgili deneysel bir çalışma yapmayı uygun bulduk. Gerek primer taş hastalığının, gerekse nükslerin engellenmesi konusunda medikal tedavide kullanılan ideal bir ajan bugün için bulunabilmiş değildir. Çalışmamızda taş hastalığının oluşumunda çok önemli bir rol oynayan hiperokzalürinin indüklediği renal tubüler hücre hasarı oluşturan apoptozisi, değişik antioksidan ajanlar (sitrat, magnezyum, allopurinol, vitamin E ve verapamil) ile engellemeyi ya da sınırlamayı amaçladık. Bu suretle söz konusu ajanların taş hastalığının önlenmesindeki klinik uygulanabilirliğini değerlendirmeyi hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 : BÖBREK ANATOMİSİ

Böbrekler retroperitoneal olarak yerleşmiş bir çift organdır. Uzun eksenleri aşağı-dışa doğru, transvers eksenleri yana-arkaya doğrudur. Kabaca 11x6x3 cm büyüklüğündedirler. Üst uçları 12. torakal vertebra üst seviyesi, alt uçları 2. lomber vertebra alt seviyesine kadar uzanır. Alt uçları krsta iliaka'dan 2.5 cm. yüksekliktedir. Karaciğerin lokalizasyonu nedeniyle sağ böbrek sola göre biraz daha aşağıda yerleşmiştir (1).

Sağ böbrek; altta kolon, üstte surrenal bezi, önde karaciğer ve hilum yakınlarında duodenum ve vena kava inferiorla komşuluk gösterir. Sol böbrek ; üstte surrenal bezi, ön-üstte mide, üst-dışta dalak, hilum bölgesinde pankreas kuyruğu, altta jejunum ve kolonla komşudur (2).

Renal pelvis 5-7 ml. kapasiteli konik bir yapıdır. Pelvis, 2-3 ana majör kalise, bunlar da papillalarda sonlanan birçok minör kalise ayrılır. Kalis boyunları infundibulum olarak adlandırılır. Renal pelvis kimi kez böbrek sinüsünün içindedir (intrarenal pevis), kimi kez de kalislerin uzun olması sonucu tümüyle böbrek dışındadır (ekstrarenal pelvis). Böbreğe giren ana vasküler yapılarla birlikte renal pelvisin bulunduğu bölüm sinüs olarak adlandırılır ve bu bölgede arkadan öne doğru renal pelvis, renal arter ve renal ven bulunur (2).

Böbreğin dışını örten fibröz kapsül sinüs içine dönerek papillaya kadar uzanır ve apse, hematom gibi olayların dışa ya da dıştaki olayların iç tarafa yayılmasını önlemek amacıyla fiziksel bir bariyer oluşturur. Bu fibröz kapsülün dışında ise böbrek renal fasya (Gerota fasyası) ile sarılmıştır. Renal fasyanın ön ve arka iki yaprağı mevcut olup iki yaprak yan kenarda birleşir. Ön yaprak medialde , böbrek damarlarının ön yüzünden orta hatta yaklaşır ve aorta ile vena kava inferior'u saran dokuya karışır. Arka yaprak quadratus lumborum ve psoas majör fasyasının önünde içe doğru uzanır. Psoas fasyasının dış ve iç kenarları ile fascia prevertebralis ve discus intervertebralis'lere tutunur (1, 2).

Böbrek parankimi, korteks ve medulla olmak üzere iki bölümdür. Medulla 8-18 adet, çizgili görünümlü piramitten oluşur. Piramitlerin tabanı kortekse bakar. Tepeleri papilla adını alır ve minör kalislere açılır. Papillanın yüzeyine 7 ana kollektör kanal açılır (Bellini Kanalları) ve bu görünümü nedeniyle area kribrosa adı verilir. Piramitler, tabanlarından korteks içine doğru çizgiler uzatır (Striata medullaris kortisis - Ferrain uzantıları) (2).

2.1.1. : BÖBREKLERİN ARTER - VEN VE LENFATİK SİSTEMİ

2.1.1.1 : Arter Sistemi

Varyasyonların çokluğu nedeniyle renal vasküler yapıda kesin bir standartı saptamak zordur. %70 oranında aortadan tek sağ ve sol renal arter olarak çıkar ve sağın çıkışı biraz daha yukardadır. Böbreğe ulaşmadan sağ renal arter; inferior surrenal, küçük perinefritik, kapsüler ve proksimal üreteral dallar verir. Aksesuar sağ renal arter olasılığı %30'dur. Bunlar ana arterin alt ya da üstünde ve ona paralel uzanarak hiluma girerler. Ancak bazı aksesuar arterler alt ya da daha sık olarak üst kutba girebilir (2, 3).

Ana renal arter geniş ön ve daha dar arka dallara ayrılır. Ön dal renal pelvisle renal ven arasında seyreder. Posterior dal pelvis ya da üst infundibulumun arkasında yer alır. Bu arterlerden çıkan segmenter arterler, böbreği beş vasküler bölüme ayırır. Bunlar; apikal, ön-üst, ön-arka, alt ve arka segmentlerdir. Segmenter arterler arasında anastomoz yoktur. Segmenter arterler her piramid için lobar arter olarak devam eder ve 2-3 interlober artere ayrılıp piramitlerin arasında kortekse kadar uzanırlar. Kortikomedüller bölgede interlober arterler piramit tabanına paralel seyretmek üzere dönerek arkuat arter adını alırlar. Arkuat arterlerden birçok interlobüler arterler çıkar. İnterlobüler arterlerin de birbiriyle anastomozu yoktur ve kortekse dik olarak uzanırlar ve bir kısmı fibröz kapsülü delerek adrenal, gonodal ve frenik damarların yaptığı kapsüler pleksusa katılırlar. İnterlobüler arterlerin ana dalları afferent glomerüler arteriolü oluşturur. Glomerüler yumaktan çıkan efferent arteriol, peritübüler kapiller ağ yaparak proksimal ve distal tubülikontortiyi sarar. Bu kapiller pleksus venöz kapillerlerle birleşerek interlobüler venlere dökülür (1, 2, 3).

2.1.1.2 :Ven Sistemi

İnterlobuler venler sırasıyla arkuat venler, interlober venler ve segmenter venleri oluşturduktan sonra birleşerek renal veni oluşturur. Arter sisteminin aksine renal parankimal venler arasında anastomoz sıktır. Sağ renal ven kısa olup doğrudan vena kava inferiora açılır. Kol sayısı azdır ve varsa yalnızca aberan gonodal veni alır. Uzun olan sol renal vene; inferior frenik, adrenal ve gonodal venler açılır. Sol renal ven; lomber venler, hemiazigoz sistemi ve küçük paravertebral venlerle birleşerek sirkumaortik pleksusu oluşturur (2, 3).

2.1.1.3 : Lenfatik Sistemi

Böbrek ve çevresinde üç lenfatik sistem yer alır. Böbrek dokusundan kaynaklanan ana lenfatik pleksus, renal tubüliler arasında seyrederek ve 4-5 adet geniş kanalla hiluma gelir, renal veni izleyerek ana lenfatik turunkusu oluşturur ve sol tarafta lateral aortik nodüllere açılır. İkinci lenfatik sistem olan subkapsüler pleksus, kapsül altı dokuları drene ederek hilumda ana lenfatik turunkusuyla birleşir. Üçüncü lenfatik sistem ise perinefritik pleksus adını alır ve subkapsüler pleksusla birleşerek ya da bağımsız olarak lateral aortik nodüllere açılır (1, 2).

Lateral aortik nodüller sol tarafta; aortanın anterior ve posteriorunda , inferior mezenterik arter seviyesinin altında yer alır. Bazı lenfatik kanallar sol böbrekten direk supradiyafragmatik ve retrokrural nodlara drene olabilir. Ancak sol tarafta interaortokaval nodüllere açılım oldukça nadirdir (2, 4).

Sağ böbrekteki lenfatik turunkusu ise, interaortokaval ve sağ parakaval lenf nodlarına dökülür. Bu nodlar inferior vena kava'nın anterior ve posteriorundadır (2, 4).

2.1.2 : NEFRONUN YAPISI

Böbreklerin fonksiyon yapan en küçük ünitesi olan nefronlar, bir böbrekte ortalama 1.5 milyon ve toplam 3 milyon kadardır. Nefron, 0.2 mm çaplı renal korpüskül (Malpighi cismi) ile başlar. Bu cisim, tek tabaka epitelden yapılmış olan Bowman kapsülüne invajine olmuş glomerül yumağından oluşur. Korpüsküle afferent arteriolün girip efferent arteriolün

çıktığı kutba vasküler kutup, Bowman kapsülünün proksimal tubülüsle birleştiği boyna da üriner kutup denir. Üriner kutuptan başlayan proksimal tubülüsler firkete şeklinde seyreden Henle kulpu ile distal tubüllere açılır ve oradan da kollektör kanallara bağlanır. 7 adet ana kollektör kanal papillanın area kribrosa adı verilen yüzeyine açılır (2).

2.2. : BÖBREK FİZYOLOJİSİ

Böbreklerin başlıca iki büyük görevi vardır : İdrar oluşturma fonksiyonu ve endokrin fonksiyonu (5, 7).

2.2.1 : İdrar Oluşturma Fonksiyonu :

İdrar oluşturma fonksiyonu ile böbrekler esasen şu 5 görevi yerine getirmektedir

- 1- Metabolizma : Özellikle protein metabolizması sonucunda ortaya çıkan; üre, kreatin, kreatinin, ürik asit, fosfatlar, sülfatlar gibi artıkların ve toksik maddelerin atılması.
- 2- Organizmada sıvı ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi.
- 3- Asit-baz dengesinin sağlanması.
- 4- Organizma için gereksiz yabancı maddelerin (çeşitli ilaçlar, boyalı maddeler...vs.) atılması.
- 5- Plazma onkotik basıncını düzenleyerek kan basıncı regülasyonunun sağlanması.

2.2.2 : Böbreklerin Endokrin Fonksiyonları:

Böbreklerin bilinen başlıca endokrin fonksiyonları şunlardır (5, 7).

- 1- Eritropoetin salgılanması
- 2- Renin salgılanması
- 3- Prostaglandin salgılanması
- 4- Kallikrein – kinin sistemi.

2.2.3 : İDRAR OLUŞUM MEKANİZMALARI

İdrarın oluşumu; glomerüler filtrasyon, tubüler reabsorbsiyon ve tubüler sekresyon sonucunda oluşur (2).

Böbrekler tüm vücut kitlesinin %1'inden azını oluşturmakla birlikte kalp debisinin %20'sini alırlar. Böbreğe gelen kanın basıncı renal arterde 100 mmHg kadardır ve

glomerül düzeyine gelindiğinde aorta abdominalisteki basıncın %60'ına kadar düşer. Yani kan basıncı ortalama 120 mmHg olan bir kişide glomerül düzeyinde bu basınç 70 mmHg düzeyine düşer ki, bu değer glomerüllerden filtrasyonu sağlayan hidrostatik basınç değeridir. Buna karşın kapiller yumak içerisindeki proteinlerin oluşturduğu onkotik basınç (25 mmHg) ve Bowman kapsülü içerisindeki hidrostatik basınç (15 mmHg), 70 mmHg'lık bu kapiller hidrostatik basınca direnç oluştururlar. Sonuçta ortalama 30 mmHg 'lık bir filtrasyon basıncı ile glomerüler filtrat oluşur. Sistemik basıncın 70 mmHg'nın altına düştüğü durumlarda bu basınç sıfırlanacak ve pratik olarak glomerüler filtrat ve idrar oluşamayacaktır. Günlük ortalama 180 litre kadar glomerüler filtrat oluşmasına rağmen bunun %99'u renal tübüllerden reabsorbe olduğundan ancak 1.5-2 litre kadarı idrar olarak dışarı atılır (2, 4, 5).

Glomerüler filtrat oluşumunda glomerül kapillerlerinin özel yapısının da büyük rolü vardır. Zira glomerül kapillerlerinin endotellerinde fenestra denilen binlerce delik bulunur. Endotel hücrelerinin dışındaki bazal membran geniş aralar içeren proteoglikan liflerden yapılmış ağ şeklindedir. Glomerül membranının dış yüzeyindeki epitel tabakasında glomerüler filtratın yarık porları mevcuttur. Bu nedenlerle glomerül kapillerlerinin geçirgenliği diğer kapillerlere göre 100-400 kat fazladır (2, 4, 5).

Ancak glomerül membranı bu büyük geçirgenliğine rağmen moleküllerin büyüklüğüne karşı aşırı bir seçicilik gösterir. Molekül ağırlığı 70.000 daltonun üzerinde olan maddeler geçemez. Sadece molekül ağırlığı da bir anlam ifade etmez. Çünkü membran deliklerinin büyüklüğü de önemlidir ki 8nm'ye kadar olan moleküller geçebilir. Bir diğer faktör de glomerül porlarının çok kuvvetli negatif yükleri olan glukoz ve protein kompleksi ile döşeli olmasıdır. Başta albümin olmak üzere plazma proteinlerinin idrara geçmesini engelleyen bariyer de budur (2, 5, 7).

2.2.4 : RENAL TUBÜLER HÜCRE FONKSİYONLARI

Tübüler absorpsiyon ve reabsorpsiyon temelde iki mekanizma ile yürütülür : Aktif transport ve pasif transport. Tübülileri örten epitel tabakasının lümene bakan yüzeyi içerdiği binlerce villus sayesinde reabsorpsiyonu kolaylaştıran adeta fırçamsı bir yüzey oluşturur (2, 5).

Tübülilerden ATP kullanarak reabsorbe olan başlıca maddeler; Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{++} , Fe^{+3} , H^+ , HCO_3^- , ürat ve fosfat iyonları ile glukoz ve aminoasitlerdir. Tübülüslerden aktif transport ile sekrete edilen maddeler ise; H^+ , K^+ ve üratır (2, 5).

Pasif transportta ise herhangi bir enerji kullanılmaksızın tamamen konsantrasyon farkı ile iyonlar yerdeğiştirir. Su, osmos ile reabsorbe edilirken lümen içerisinde üre konsantrasyonu artar ve tübülüslerden interstisyuma üre diffüzyonu oluşur (2, 4, 5).

2.2.4.1 : TUBÜLİ SEGMENTLERİNİN ABSORBSİYON YETENEKLERİ

Proksimal Tübül :

Proksimal tübül hücreleri içerdikleri çok sayıda mitokondri sayesinde çok hızlı aktif transport sağlayacak şekilde donanmışlardır. Tüm tübül sistemi içerisindeki reabsorbsiyon ve sekresyonun %65'i proksimal tübüllerde gerçekleşir. Ayrıca zengin bir interselüler labirent sistemi ve bazal kanallar yardımıyla interstisyel sıvı tarafı da geniş bir membran yüzeyi kazanmıştır. Proksimal tübül epitelinin bir diğer özelliği de, hücreler arası bağlantının çok sıkı olmayışdır ki bu özellik su ve birçok küçük molekülün kolayca reabsorbsiyonunu sağlar (5, 7).

Henle Kulpu :

Bu kısımda epitel çok ince olup hücreler çok az mitokondri içerdiklerinden metabolik aktivite minimaldir. Bu ince segmentin inen kolu suya çok geçirgen olup Na^+ ve diğer iyonlara orta derecede geçirgenlik gösterir. İnce segmentin çıkan kolu ise suya daha az geçirgen olup üreye çok geçirgendir. Çıkan kolun kalın kısmında ise epitel oldukça kalınlaşır ve afferent ve efferent arterioller arasından yukarı doğru yükselerek jukstoglomerüler kompleks adı verilen oluşumu yapar. Bu yapı nefron fonksiyonunun regülasyonunda çok önemli roller oynar. Henle kulpunun bu kısmında epitel proksimal tübülüs epiteline benzemekle birlikte bazal kanalların sayısı daha az , fırça kenarı rudimenter olup hücreler arası bağlantılar daha sıkıdır. Bu kısımda esasen Na^+ , K^+ ve Cl^- iyonlarının aktif transportu gerçekleşirken su ve üreye geçirgenlik hemen hemen hiç yoktur. Sonuçta bu bölümde tübülüs sıvısı çok seyrelmiş olmakla birlikte üre konsantrasyonu yüksektir (5, 7).

Distal Tubülüs :

Distal tubülün iki önemli fonksiyonel bölümü vardır : sulandırıcı segment ve kortikal toplayıcı tubül. Sulandırıcı segment, Henle kulpunun çıkan kalın koluyla aynı morfoljik ve karakteristik özellikleri taşır. Kortikal toplayıcı tubüllerde ise sulandırıcı segment gibi üre hemen hiç geçmez ve böylelikle idrarla atılacak ürenin hepsi kollektör kanallara geçer. Bu kısmın en büyük özelliği aldosterona bağımlı Na^+ reabsorbsiyonu ve K^+ sekresyonunun gerçekleştirmesidir. Ayrıca bir diğer önemli özelliği, ADH (antidiüretik hormon) varlığında suya geçirgen olmalarıdır. Bir başka deyişle idrarın ne kadar sulandırılacağını bu bölüm belirler (5, 7).

Toplayıcı Kanallar :

Buradaki epitel hücreleri kübik şekilde, yüzeyleri düzgün ve az sayıda mitokondri içerirler. Bu bölgede yine ADH bağımlı su reabsorbsiyonu ile birlikte az miktarda üre reabsorbsiyonu da gerçekleşir. Bu bölgenin ikinci büyük özelliği de çok yüksek bir H^+ gradientine rağmen lümene aktif olarak hidrojen iyonu sekresyonunun yapılabilmesidir. Bu da vücut asit-baz dengesinin devamında son derece önemlidir (5, 7).

2.2.4.2 : TUBÜLİLERİN FARKLI SEGMENTLERİNDEN SU VE İYONLARIN REABSORBSİYON VE SEKRESYONU

Suyun Tubülilerdeki Döngüsü :

Su transportu tamamen osmotik diffüzyonla olur. Reabsorbsiyonun %60'ı proksimal tubülüslerden, %15'i Henle kıvrımlarından, %10'u distal tubüllerden, %9'u toplayıcı kanallardan olur. Bu oranlardan anlaşılacağı üzere tubüli lümenindeki sıvı hacim giderek azalır ve glomerüler filtrat içerisindeki suyun sadece %1'i idrara geçer (2,5).

Sodyum

Glomerüler filtrat içerisindeki Na^+ 'ın %65'i proksimal tubülüslerden, %25'i Henle kıvrımlarından, %5'i distal tubüllerden, %1'i kollektör kanallardan reabsorbe edilirken sadece %0,6'lık kısmı idrarla atılır. Na^+ reabsorbsiyonu elektrokimyasal potansiyel gradientlerinin etkisi altında aktif transportla olur (5).

Potasyum:

K^+ reabsorbsiyonunun tamamı proksimal tubüller ve Henle kulpundan $Na^+ - K^+$ ATPaz mekanizmasıyla olurken, distal tubüller ve kollektör kanallardan sekrete edilir.

Sekresyonda negatif intratübüler potansiyel ile birlikte mineralokortikoidlerin $Na^+ - K^+$ ATPaz uyarısı rol oynar (3, 5).

Klor:

Glomerüler filtrattaki klorun %99'u reabsorbsiyona uğrar. Bu reabsorbsiyonun az bir kısmı proksimal tubüllerde olurken büyük çoğunluğu distal tubüllerden olur. Proksimal tubüllerden geri emilim, bu bölgeden suyun aşırı emilimi ve sodyumun aktif olarak geri emilimi sonucu oluşan peritübuler sıvıdaki aşırı pozitif iyon yükünü azaltmak için olurken distal tubüllerden olan reabsorbsiyon aktif transport ile olur (2, 5).

Kalsiyum :

Glomerüler filtrattaki Ca^{++} 'mün %96-98'i reabsorbe olur. Bu geri emilimin büyük kısmı proksimal tubülüs ve Henle'nin çıkan kolunda, az bir kısmı da distal tubüller ve kollektör kanallardan olur. Proksimal tubülüslerden Ca^{++} reabsorbsiyonu; PTH (parathormon), cAMP, asetozolamid, dışardan Na^+ yüklenmesi ve fosfat kaybıyla inhibe olur. Henle kulpu, distal tubül ve kollektör kanallardaki Ca^{++} reabsorbsiyonu PTH ile uyarılır. Proksimal tubülünün son ve distal tubülünün ilk bölümü arasındaki Ca^{++} reabsorbsiyonunu uyaran diğer faktörler; hipokalsemi, metabolik alkalozda tubüler HCO_3 artımı, D vitamini ve fosfat yüklenmesidir. Buna karşılık hiperkalsemi ve fosfat kaybında reabsorbsiyon inhibe olur (5, 7).

Fosfat :

Glomerüler filtrata geçen fosfatın %80-97'si reabsorbsiyona uğrar. Bunun çok büyük kısmı proksimal tubülüslerden olur ki PTH bu reabsorbsiyonu inhibe eder. PTH'ın bu etkisi nefrojenik cAMP ekskresyonunun artımıyla birliktedir (5, 7).

Tubülüslerdeki H^+ – HCO_3^- Döngüsü :

Hidrojen iyonları; proksimal tubül, distal tubül ve kollektör kanallardan aktif transport ile sekrete edilir. Bu, vücut asit-baz dengesinin korunmasında temel taşlardan birisidir. HCO_3^- iyonları ise epitel tarafından salgılanan H^+ iyonları ile birleşerek karbonik asiti (H_2CO_3) oluşturur. Oluşan H_2CO_3 , su ve CO_2 'te ayrıştıktan sonra lipitte kolayca eriyen CO_2 tubülüs membranından hızla diffüzyona uğrayarak peritubüler kana geçer. Şayet tubülüs lümeninde hidrojen iyonundan daha fazla HCO_3^- varsa bu fazlalık idrarla çıkartılır. Çünkü tubül hücrelerinin bu iyonlara geçirgenliği son derece azdır (2, 5, 7).

2.2.4.3 : ORGANİK ERİYİKLER VE VÜCUT İÇİN BESLENME DEĞERİ OLAN MADDELERİ REABSORBSİYONU :

Glukoz glomerüllerden serbestçe filtre olmakla birlikte filtre olan bu glukozun tamamı proksimal tubülüslerden reabsorbe olur. Bu nedenle normal idrarda glukoz yoktur. Ancak plazma glukozunun aşırı yükseldiği durumlarda peritubüler kapillerler içindeki glukoz reabsorbsiyonuna engel bir konsantrasyon gradiyenti oluşturur ve idrarla glukoz atılımı başlar (3, 5).

Aminoasitlerin hemen hemen tamamı glomerüler filtrata geçer ancak yine tamamı proksimal tubüllerden reabsorbe edilir. Sistin ve diğer dibazik aminoasitlerin tubüler transportu önemlidir. Klasik sistinüride sistin reabsorbsiyonu bozuk olduğundan insolübl olan sistin, taş oluşumuna neden olur (3, 5).

Protein katabolizmasının son ürünü olan üre glomerüllerden serbestçe filtre edilir. Proksimal tubülüslerde aşırı su emilimi ile birlikte lümeninde artan üre yükü reabsorbsiyona neden olur. Ürenin yaklaşık %30-40'ı proksimal tubüllerden reabsorbe edilir. Üre reabsorbsiyon hızı tubüler sıvının akım hızıyla ters orantılıdır (3, 5).

Ürik asit, purin metabolizmasının son ürünüdür. Alınan ürik asitin 2/3'ü böbrekler yoluyla atılırken geri kalan kısmı bakteriyel enzimlerle parçalanarak barsaklarla atılır. Ürik asit sekresyonu proksimal tubülü organik anyon ekskresyon mekanizmasıyla yapılır (3, 5).

Glomerüllerden filtre edilen sitrat, Ca ile şelat oluşturarak taş oluşumuna engel olur. Glomerüllerden süzülen sitratın %65-80'i proksimal tubüllerden reabsorbe edilirken %10-35'i idrarla atılır. Üriner sitrat düzeyi sistemik asit-baz dengesiyle yakından etkilenir. Metabolik alkaloz, sitrat ekskresyonunu artırır. Metabolik asidoz ise tam tersi etki gösterir (3, 5).

2.3 : ÜRİNER SİSTEM TAŞ HASTALIĞI ETİYOLOJİSİ

Üriner sistem taş hastalığı, üriner sistem enfeksiyonları ve prostat patolojilerinden sonra üriner sistemi etkileyen üçüncü en sık patolojidir. Varlığı M.Ö. 4800 yıllarından beri bilinen taş hastalığı ile ilgili özellikle 1940'lardan sonra birtakım fizyolojik gözlemler ve taş teşekkülünde etkili metabolik anomaliler ile ilgili araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Bugün için taşın kimyasal ve strüktürel yapısı ile ilgili yeterli bilgiler sağlanmakla birlikte üriner sistem taş hastalığının etiyolojisi tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Çünkü taş hastalığı tek bir nedene bağlı olmayıp kompleks, birbiriyle ilişkili birçok faktörün biraraya gelip rol oynadığı olaylar dizisidir (2).

Üriner sistem taş hastalığında etiopatogenezi açıklamaya yönelik başlıca öne sürülen teoriler şunlardır: (2, 4)

- 1- Süpersatürasyon-kristalizasyon teorisi
- 2- İdrarda bulunan inhibitör ajanların eksikliği teorisi
- 3- Matriks-nükleasyon ve epitaksi teorisi
- 4- Kombine teoriler

2.3.1 : SÜPERSATÜRASYON – KRİSTALİZASYON TEORİSİ :

Belirli bir pH ve sıcaklıktaki suya kristalize olabilen bir element konulduğunda solüsyon halinde kalır. Ancak bu element miktarı artırıldığında belirli bir doygunluk derecesine ulaşır (solubility product) ve element miktarı daha da artırıldığında kristalizasyon oluşmaya başlar (formation product) (2). Ancak bu kimyasal durum idrara uyarlandığında idrarın birçok maddeyi solüsyon halinde tuttuğu gözlenir. Bunu da sağlayan; idrar akım hızı ve idrar inhibitörlerinin varlığıdır (4). Normal çalışan bir nefronda idrarın glomerüllerden süzülükten sonra toplayıcı kanallara gelmesi 2-5 dk sürer. Tubül lümenleri ise yaklaşık 20-200 mikron kadardır. Süpersatürasyon olması için idrarın 200 mikron çapındaki lümeninde 90-1500 dk kalması gerekmektedir. Bu noktadan hareketle normal çalışan bir böbrekte ve anatomik bozukluk olmayan bir üriner sistemde ne kadar zor taş oluşacağı anlaşılabilir (4).

2.3.2 : İNHİBİTÖR EKSİKLİĞİ TEORİSİ

Organik ya da inorganik olabilirler. İlk tespit edilenleri, 1967 yılında Howard tarafından tanımlanan Portland maddesidir ki daha sonra yapılan çalışmalar bunun fosfositrat yapısında olduğu tespit edilmiştir. Ca okzalat ve Ca fosfat için iyi tanımlanmış olanlar; Mg^{++} , sitrat, pirofosfat, nefrokalsin, glikozaminoglikanlar, RNA fragmanları, Tam-Horsfall proteinleri ve üropontindir. Nefrokalsin; proksimal tüp epitelinde sentezlenir. Yapısında gamakarboksiglutamik asit ve lipostatin adı verilen iki protein vardır. Ca okzalat taşı olanlarda normal bireylere göre idrarda 10 kat azalmış olarak saptanmıştır (4, 6).

Tam-Horsfall proteinleri ise nefrokalsinden 10 kat daha potent olup Henle kulpunun çıkan kolunda ve distal tübüllerde sentezlenir (4, 6, 37).

Diğer önemli bir inhibitör; üropontindir. Bu, human osteopontine aspartik asit eklenmesiyle oluşur. Esasen Ca-okzalat-monohidrat matriksinde bulunarak agregasyonu önler.

α -1 antitripsin ise yine bu matrix içinde bulunur ve kan elemanlarının matrikse yapışmasını engeller (8, 9, 18).

Renal taş oluşumunda üriner enzimler olan ürokinaz ve sialidazın rolü üzerinde yapılan araştırmalarda düşük ürokinaz ve yüksek sialidaz düzeylerinin matriks oluşumu üzerine etkili olduğu gösterilmiştir ve bu tabloyu Proteus mirabilis ve E.coli'nin oluşturduğu ve taş hastalarının 1/3'ünde bu mikroorganizmalarca oluşan İYE'nun varlığını gösterilmiştir (9).

Ryall; en etkin olan inhibitörün protrombin fragman-1 olduğunu ve Tam-Horsfall proteinleri ve nefrokalsinin taş hastalarında normal hastalara nazaran düzeyinin değişmediğini ileri sürmüştür (51).

2.3.3 : MATRİKS -NÜKLEASYON VE AGREGASYON- EPİTAKSİ TEORİSİ

Matriks, idrardaki proteinlerin bir ürünü olup hekzan ve hekzanaminleri içerir. Proksimal tüp hücrelerinde yapılan matriks, bir yandan kristalizasyon ve agregasyonu engellerken diğer taraftan taş yapısının %2-10'unu oluşturur (6).

Nükleasyon denilen olay; erken süpersatürasyon döneminde oluşan ve ilerde taş oluşumu için bir nevi şablon görevi gören yapıların oluşmasıdır. Epitelyal hücreler, hücre artıkları, eritrositler ve diğer kristal partikülleri ile α -1 ve α -2 globulinler, bu nükleasyonu oluşturan öğelerdir (6, 17).

Epitaksi; kristalizasyonun başlamasını takiben kristalizasyon yapan maddenin saturasyonunun azalması ve buna bağlı başka bir maddenin gelip ilk kristalin yüzeyine yapışması olayıdır. Bunun en güzel örneği, ürik asit kristalleri üzerine kalsiyum ve okzalatın yapışmasıdır (6, 18).

Özetle; taş hastalığının etiopatogenezinde öne sürülen bu teorilerin kombine edilmesinde ortaya çıkan sonuç; idrar akımında staza sebep olabilecek olayların katkısı ile taş oluşumuna odak teşekkül edecek matriks, nükleus adı verilen taş öncüllerinin idrarda aşırı doygunluğa ulaşip, kristalizasyon ve agregasyona yol açması ve ortamda bu gelişmeleri engelleyen inhibitör maddelerin olmaması sonucunda taş hastalığı şekillenmektedir (6).

2.3.4 : TAŞ HASTALIĞINDA RİSK FAKTÖRLERİ

Üriner sistem taş hastalığının gelişiminde yukarıda bahsedilen etiyolojik faktörlerle bağlantılı olarak birtakım risk faktörleri söz konusudur. Bunların başlıcaları; (2, 3, 4)

- 1- Hiperkalsüri
- 2- Hiperokzalüri
- 3- Hiperürükozüri
- 4- Hipositratüri
- 5- Hipomagnezüri
- 6- Hiperfosfatüri

Üriner sistem taşlarının içeriğine bakıldığında en sık görülen taş cinsinin Ca-okzalat taşları olduğu ve idiyopatik Ca-okzalat taşları için en önemli risk faktörünün de hiperokzalüri olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu konuda daha önce yapılan çalışmalarda taş hastalığının patofizyolojisini anlamak için invivo model olarak ratlar ve tavşanlar kullanılmıştır. Khan , yaptığı deneysel çalışmada; tavşanların içme sularını %0.25, %0.50 ve %0.75'lik etilen glikol içecek şekilde düzenlediklerinde, normal distile su ile beslenen kontrol grubuyla karşılaştırıldığında üriner okzalat içeriğinin sırasıyla %62, %105 ve %206 oranında artmış olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada kristalüri ve renal papillalarda

oluşan nefrolityazis ile hiperokzalürik diyet arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Daha sonra yapılan birçok çalışmada etilen glikol içeren diyetle beslenen hayvanlarda değişik oranlarda hiperokzalüri olduğu gösterilmiştir (14, 40).

2.3.5 : OKZALAT METABOLİZMASI

Metabolizma içerisindeki okzalatin %10-15'i diyetle alınırken geri kalan %85-90'ı endojen kaynaklı okzalattır. Normal diyetle alınan okzalatin sadece %10-15'i incebarsaklardan emilirken geri kalanı kolonda bakteriyel çözünmeye uğrayarak dışkıyla atılır. Barsak lümeninde Ca'mun varlığı emilen okzalat miktarını etkileyen önemli bir faktördür. Barsaktan emilen okzalat oldukça solubl olup tamamı böbreklerden atılır. İdrarla günlük atılan okzalat miktarı 40 mg olup bu değerini üzeri hiperokzalüri olarak kabul edilir. Hiperokzalüri esasen üç nedene bağlı ortaya çıkar (8, 9, 25).

- 1- Artmış okzalat üretimi: Pirimer hiperokzalüri ve artmış karaciğer dönüşümü.
- 2- Artmış okzalat absorpsiyonu.
- 3- İdiyopatik hiperokzalüri.

2.3.5.1 : PRİMER HİPEROKZALÜRİ:

Başlıca 2 tipi vardır.

Tip 1: O.r. geçişli olup karaciğerde alanin gliokzalat aminotransferaz enzimindeki defekte bağlı aşırı okzalat üretimi vardır. CVB ile veya fetal karaciğer biyopsisi ile erken tanı konabilir, aksi halde fatal seyreder ve genelde 20 yaş altında ex olurlar (18).

Tip 2: D gliserat dehidrogenaz ve gliokzalat redüktaz enzimlerindeki defekte bağlı üriner Ca ve okzalat atılımında artış vardır. Oldukça nadir olup literatürde 21 vaka bildirilmiştir (18).

Her iki tipte de, erken çocukluk çağında nefrokalsinozis, tubülointerstisiyel nefropati ve KBY ortaya çıkar. Tedavisinde yüksek doz (200-400 mg) piridoksin verilerek üriner okzalat atılımı ve karaciğer üretimi azaltılabilir. Yanısıra oral sitrat, tiazidler, nötral fosfatlar ve Mg-glukonat verilebilir ancak hepsinin de yararlanımı kısıtlı olup palyatif tedavidir. Bu hastalarda karaciğer transplantasyonu deneme aşamasındadır (6, 9, 18).

2.3.5.2 : ARTMIŞ HEPATİK DÖNÜŞÜM

En sık 3 durumda görülür:

- 1-Piridoksin eksikliği.
- 2-Etilen glikol zehirlenmesi.
- 3-Metoksifluran anestezisi

Piridoksin (Vitamin B6), gliokzalatın glisine transaminasyonunda rol oynayan bir koenzim olup eksikliği durumunda aşırı biriken gliokzalat, okzalata dönüşmektedir. Piridoksin eksikliğinin rat ve kedilerde hiperokzalüri ve okzalat taşlarına neden olduğu gösterilmiştir (14). Piridoksin eksikliği sadece hiperokzalüriye neden olmayıp ayrıca üriner kalsiyum atılımını da artırmaktadır ve nörominidaz ve diğer lizozomal enzimlerin aktivitesini artırmaktadır. Nörominidaz enzimi, GAG 'ların (glikozaminoglikan)önemli bir üyesi olan sialik asiti yıkmak suretiyle üriner sitrat düzeyinin azalmasına neden olur ki sitrat, kalsiyum okzalat kristalizasyonunu inhibe eden en önemli ajanlardan biridir (14, 24).

Artmış hepatik dönüşüm nedeni diğer iki faktör nadir görülmektedir. Motorlu araçlarda sıvıların donmasını engellemek amaçlı kullanılan antifrizin yanlışlıkla alımında karaciğerde yüksek oranda okzalata dönüşmektedir. Yine bir inhalasyon anestezisi olan metoksifluranın uzun süre verilmesi durumunda karaciğerde okzalata yıkılıp hiperokzalüriye neden olabilmektedir (14, 24).

2.3.5.3 : ENTERİK HİPEROKZALÜRİ

Malabsorbsiyon, kısa barsak sendromu, inflamatuvar barsak hastalıkları ya da jejunoileal by-pass durumlarında kolon içeriğinde emilmeyen yağ asitlerinin artması, hem barsak permabilitesini artırarak hem de enterik Ca^{++} ile şelat oluşturmak suretiyle aşırı okzalat emilimine neden olur (6, 9).

2.3.5.4 : İDİYOPATİK HİPEROKZALÜRİ

Ca taşlı hastaların %3-50'sinde, tüm taş hastalarının da %37'sinde saptanmıştır. (6) Aslında bu grup hastalar dikkatli irdelendiğinde okzalat içeren ıspanak, fındık, fıstık,çikolata, çilek ve çay gibi gıdaları fazla tükettikleri görülür. (18) Son yıllarda yapılan çalışmalarda idiyopatik Ca okzalat taşlı hastaların %79'unda kırmızı küre membranında okzalatın artmış dönüşümü gösterilmiştir (4, 9).

2.3.5.5 : HİPEROKZALÜRİNİN OLUŞTURDUĞU RENAL HASAR

Hiperokzalürinin indüklediği Ca-okzalat taşı gelişiminde, okzalat iyonlarının ya da Ca-okzalat kristallerinin renal epitelyal hücrelerde oluşturduğu hasar kritik rol oynamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda Ca-okzalat kristallerinin esas hedef hücresinin renal tubüler hücreler olduğu gösterilmiştir. Ortaya çıkan bu değişiklikler, hem hiperokzalürinin kendisine hem de bu durumun ortaya çıkardığı kristal teşekkülüne bağlı olmaktadır. Okzalat iyonlarının ve takibinde Ca-okzalat kristallerinin renal tubüllerde ortaya çıkardığı bu hasar; değişik derecelerde morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler, artmış hücresel proliferasyon ve konsantrasyon ve sonuçta hücre ölümü şeklinde olmaktadır. Başlangıçta bu konuda yapılan çalışmalarda bu hücre ölümü nekroz şeklinde tanımlanırken son yıllarda yapılan çalışmalarda bunun klasik nekroz değil, programlanmış hücre ölümü, yani apoptozis ile olduğunu göstermiştir (36, 43, 45, 48).

2.4 : APOPTOZİS

Apoptozis; eski Yunanca apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuş ve mitolojide "sonbaharda yaprakların düşerek ağacı terketmesi" anlamında kullanılmış bir sözcüktür. Mitolojideki anlamına uyan bir şekilde, hücrelerin adeta kuruyarak vücudu terketmesi ve arkadan gelen yeni hücrelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipine "apoptozis " denmiştir. İlk kez 1973 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Takibinde 1980 yılında Wyllie ve arkadaşları tarafından glukokortikoidlerle karşılaşan timositlerde yapılan çalışmalar bu konuda yapılacak çalışmalara öncülük etmiş ve apoptozisin kanserle ilişkisi saptandıktan sonra daha büyük önem kazanmıştır (9,10).

İlk tanımlanmasından itibaren kısaca programlanmış hücre ölümü şeklinde anlatılmasına rağmen son yıllarda yapılan araştırmalar programlanmış hücre ölümünün iki şeklinin olduğunu ortaya koymuştur.

- 1 - Apoptotik programlanmış hücre ölümü: Apoptozisin tüm morfolojik özelliklerini gösterir.En klasik örneği yenidoğanda görülen timus involüsyonudur.
- 2 - Nonapoptotik programlanmış hücre ölümü: Aynı şekilde programlanmış bir olay sözkonusu olmasına rağmen apoptoziste izlenen klasik morfolojik değişiklikler izlenmez.

Bunun da en klasik örneği, fetal hayatta varolan parmak arası perdelerin ortadan kaybolmasıdır. Ancak her iki tipin de ortak özelliği; ölüm öncesi novo gen ekspresyonunun gerekmesidir (9, 10).

2.4.1 : APOPTOZİSİN EVRELERİ VE NEKROZDAN FARKLARI

Hücre ölümünde önemli bir başka yol da nekrozdur. Ancak nekrozla apoptozis birbirinden oldukça farklı ölüm tipleridir. Apoptozis için öncelikle novo gen ekspresyonu ve enerji gereklidir, bunun sonucunda DNA'yı parçalayan endonükleazlar sentezlenmektedir. Ayrıca apoptozis bu şekilde sinyale cevap verecek olgunlukta hücrelerde ortaya çıkar. Nekrozda ise hücrenin bu şekilde bir diferansiasyona erişmiş olması gerekmez

Apoptozisin evreleri şunlardır; (10, 11, 13)

- 1- Hücrenin hacim kaybı: Hücre hacmi yaklaşık %30 azalır. Bu olaya H^+ ve Na^+ iyonlarını karşılıklı değiştiren bir pompanın bloke olmasının neden olduğu sanılmaktadır. Nekrozda ise tam tersine hacim artışı vardır.
- 2- Kromatin kondansasyonu: Çekirdekte stoplazmaya paralel bir kondansasyon gelişir. Bu sırada kromatin ağı genellikle nükleer membrana yapışık, kompakt granüler yapılar oluşturmaya başlar. Nükleoluslar büyür ve kromatin ağları kabalaşır. Nekrozda ise bu piknoz gelişirse de kromatin ağı uniform bir kondansasyon gösterir.
- 3- Stoplazmik değişimler: Apoptozis sırasında stoplazmada hacim kaybının yanısıra mikrovilluslar da oluşmaya başlar. Epitelyal karakterli hücrelerde bu devrede desmozomlar açılır ve stoplazmada vakuoller belirmeye başlar. Yine de son evreye kadar stoplazmik organeller sağlamdır. Bunun da nedeni apoptozisin enerji gerektiren bir durum olmasıdır. Nekrozda ise ilk darbeyi alanlar organeller olur ve kısa sürede ortadan kaybolurlar.
- 4- Çekirdek parçalanması: Apoptoziste çekirdek parçalanır ve DNA içeriği stoplazmaya dağıldıktan sonra endonükleazlarca kırılmaya başlar. Nekrozda ise çekirdek adeta eriyerek hayalet haline gelir (karyolizis).
- 5- Apoptotik yapıların oluşumu: Bu evrede stoplazmik zarla çevrili ve içinde organeller, çekirdek parçaları ve vakuoller bulunabilen apoptotik yapılar oluşur.

6- Fagositoz.:Bu evrede apoptotik yapılar çevre dokularca fagosite edilmek suretiyle ortadan kaldırılır. Bu yapılar membranla kaplı olduğundan kemotaktik özellikli maddeler doku içine dökülerek inflamasyon geliştirmezler. Nekrozda ise sitoliz sonucu ortaya çıkan kemotaktik maddeler inflamasyona neden olur.

Apoptozisin başlangıç ve bitimi arasında genellikle 2-3 saat geçer. Bazı hücrelerde bu süre 20 dakikaya kadar inebilmektedir. Bunun da nedeni bazı hücrelerde apoptozis için gereken proteinlerin hazır halde olması gösterilmektedir (9, 10, 11).

2.4.2 : APOPTOZİS PATOGENEZİ İLE İLGİLİ TEORİLER

Apoptozis oluşumunda hücre içi ya da dışından birtakım uyarıların rol oynadığına dair birtakım kanıtlar vardır. Bu olayda rol oynadığı öne sürülen başlıca sitokinler (G-CSF, GM-CSF, IL-6...vb.) ve genetik bozukluklar (p53, c-myc, bcl-2) her geçen gün artmaktadır. Ancak uyarın ne olursa olsun aynı morfolojik görünüm izlenmekte ve bu da patogenezin tek olduğunu düşündürmektedir. Patogenez konusunda çok farklı teoriler olmakla birlikte başlıca ikisi kayda değerdir (12, 21, 22).

1- Oksidan stres: Hücrede normalde oksidan ve antioksidan maddeler arasında bir denge vardır. Apoptozis oluşumunda bu dengenin oksidanlar lehine bozulması sözkonusudur. Bunu destekleyen çalışmalar;

- Belli miktarda H₂O₂ ile karşılaşan hücrelerde apoptozis gelişmekte, bu miktar arttığında nekroz görülmektedir.
- Apoptozisi engelleyen bir protein olan bcl-2, süperoksit dismutazla etkileşerek bu özelliğini göstermektedir.
- Apoptozise yolaçan TNF reseptörlerinin uyarılması ile reaktif oksijen radikalleri ortaya çıkmakta ve bu radikaller p53 birikimine yolaçarak apoptozisi kolaylaştırmaktadır.

2- Matürasyon promotör faktör (MPF): Bu faktör normal hücrelerde mitoz esnasında G2 fazından M fazına geçişi sağlar. MPF'yi oluşturan iki ayrı yapı vardır. Bunlar p34 ve cyclinB'dir ve hücrede eşit miktarlarda bulunurlar ki p34'ü aktifleyen, hücreye cyclin-B'nin bağlanmasıdır. Normalde mitozun başlangıcında p34'ün 15. pozisyonundaki tirozin

defosforile olur ki, mitozu tetikleyen faktör de budur. Araştırmacılar apoptoziste de aynı olayın olduğunu göstermişlerdir. Ancak apoptoziste mitozdan farklı olarak hücre siklusununun durdurulması apoptozisi engellememektedir (11, 12).

2.4.3 : APOPTOZİSİN ETKİLEDİĞİ OLAYLAR

Apoptozis vucutta bir çok fizyolojik olayda rol oynamaktadır. Bu fizyolojik olayların başında hücre turn over'ının sağlanması gelir. Deri, barsak epiteli ,kan hücreleri gibi turn over'ı hızlı yerlerde yaşlanan hücreler apoptozisle ortadan kaldırılarak yeni hücrelere yer açılmaktadır. Örneğin; normal erişkinde günde $50-400 \times 10^2/\text{kg}$ polimorfonükleer hücre yapılmaktadır. Yaklaşık yarı ömrü 1-2 gün olan bu hücreler ortadan kalkmazsa yeni yapılan hücrelerle birlikte anormal bir hacme ulaşabilir (12, 13, 21).

Apoptozisin rol oynadığı bir diğer önemli olay da, endokrin hiperplazi ya da involüsyonudur. Uygun hormonal stimulus sonucu endokrin hücrelerde apoptotik ölüm engellenmekte ve hiperplazi gelişmektedir. Bu uyarı ortadan kalktığı zaman ise fazla olan hücre kitlesi apoptozise gitmekte ve böylece involüsyon gerçekleşmektedir. Örneğin laktasyon sırasında PRL (prolaktin) etkisiyle meme hücrelerinde apoptozis engellenirken bu dönem sona erince apoptozis yoluyla involüsyon gelişmektedir. Tam olarak dolaşım kesildiğinde ise daha çok nekroz gerçekleşmektedir (13, 21).

Radyasyon, sıcak şoku ve kemoterapötikler de apoptozise yol açabilmektedir. Özellikle malign hücrelerde bu etkenlerle apoptozis indüklenebilmektedir. Ancak yine fazla dozlarda aynı etkenler nekroza yol açabilmektedir (13, 21).

İmmün sistemin şekillenmesinde de apoptozis çok önemli rol oynamaktadır. Apoptozisin en klasik örneği sayılan yeni doğan timusunun involüsyonu sonucunda T lenfositlerin yaklaşık % 98'i seleksiyona uğramaktadır. Ayrıca "memory" hücrelerde apoptozisin baskılandığı belirtilmektedir. Bunun fizyolojik önemi, "memory" B lenfositlerin duyarlı olduğu uyarının yeniden gelmesi durumunda hazır bulunmalarını sağlamaktadır (12, 13, 22).

2.4.4 : APOPTOZİSİ UYARAN FAKTÖRLER

Apoptozisi uyaran çok çeşitli faktörler varsa da bunları 4 ana grupta toplamak mümkündür: (13)

- 1- Büyüme faktörleri
- 2- Onkogenler
- 3- Tümör supressör genler.
- 4- Diğer: Radyasyon, sıcak şoku ve kemoterapötikler .

Her geçen gün yeni bir uyaran tanımlanmakta, eski tanımlanmış bir uyarının yeni ve eski çok farklı bir etkisi gözlenmekte, kısaca bilgiler arttıkça bilinmeyenler de artmaktadır.

Normal hematopoetik hücrelerin varlıklarını devam ettirebilmesi için uygun büyüme faktörünün bulunması gerekmektedir. Örneğin polimorfonükleer lökositler için G-CSF (granülosit koloni stimülan faktörü), makrofajlar için M-CSF (makrofaj koloni stimülan faktörü) bu tip büyüme faktörleridir. Uygun büyüme faktörünün azalması genellikle apoptozisle sonuçlanmaktadır. Monositlerde TNF (tümör nekrozis faktör), IL-1 (interlökin-1), GM-CSF, lipopolisakkaritler ve IFN (interferon), apoptozisi engellemektedir. Lipopolisakkaritlerin apoptozisi engellemesi , monositlerin enfeksiyon bölgesinde bulunma süresini uzatmakta ve böylece enfeksiyona karşı bir direnç mekanizması oluşturmaktadır. IL-4 ise apoptozisi uyarıcı etki yapmaktadır. Bilindiği gibi IL-4, antienflamatuar özellikte bir sitokindir. Bulunduğu ortamda apoptozisi artırması monositlerin apoptozisle ortamdaki kaybolmasına ve sonuçta enflamasyonun baskılamasına yol açmaktadır. Makrofajlarda ise M-CSF, düşük miktarlarda viabiliteyi sağlarken, normal miktarda proliferasyonu da sağlamaktadır .Myeloid lösemi hücre kültürleri olan M1-MLL ve 7-M-12-MLL, TGF- β ile karşılaştığında apoptozis gelişirken, M1-MLL hücrelerinde G-CSF ve IL-6, 7-M-12-MLL hücrelerinde GM-CSF ve IL-3 apoptozisi önlemektedir. Görüldüğü gibi birbirine benzer hücrelerde bile farklı faktörlerle farklı cevaplar elde edilebilmektedir. "Tumor promoting phorbol acetate" ise Na^+/H^+ pompasını bloke ederek hemen hemen tüm hücrelerde apoptozise yol açabilmektedir (10, 11, 13, 23).

Hücre yüzey reseptörlerine karşı oluşan antikorlar da apoptoziste etkin olabilmektedir. Örneğin; sinir büyüme faktörü (NGF) reseptörü süper ailesinin üyelerinden olan AP-1 'in uyarılmasıyla apoptozis gelişebilmektedir. Bu reseptör hemen tüm hücrelerde bulunduğu için gelecekte kanser tedavisinde sınırlı vakalarda tedavi amacıyla kullanılabilir (11, 12, 13).

2.4.5 : APOPTOZİSİ BELİRLEME METODLARI

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

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

3 - Son zamanlarda formalin fikse parafin bloklardaki dokularda apoptozisi belirlemede iki teknik geliştirildi. Birisi terminal deoxytransferase-mediated bio-dUTP nick and labeling (TUNEL), diğeri ise in situ end labeling (ISEL) adını almaktadır. Her iki teknik de enzimatik reaksiyonlara dayanarak apoptotik hücredeki parçalanmış kromatini belirlemektedir. Böylece, belirlenen DNA immünohistokimyasal olarak gösterilmektedir (11, 12, 13).

2.4.6 : APOPTOTİK BELİRLEYİCİLER

Apoptozisin indirek tespitinde kullanılan ve üzerinde yoğun olarak çalışmalar sürmekte olan birtakım belirleyiciler tanımlanmıştır. Özellikle kanser patogenezi ile yakından ilişkili bu belirleyiciler tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Promotor ve inhibitör özellikte apoptotik belirleyiciler.

Promotor Faktörler		İnhibitör Faktörler
İntrinsik	Ekstrinsik	Antioksidanlar
Onkogenez	TNF	Bcl- 2
Clusterin	TGF- β	P 53 mutant geni
c- myc	İskemi	EGF
wild tip p53 geni		Hepatik büyüme faktörü

Bcl -2

18q21 lokusunda bulunan ve üç eksondan oluşan bir gen ve kodladığı protein aynı isimle anılmaktadır. Bu lokustan alternatif splicing mekanizmasıyla birbirine benzer iki protein kodlanır; p26-alfa ve p22-beta . Bu proteinler lipofilik özelliktedir ve mitokondri iç zarında bulunur. Bcl-2'nin artışı diğer bazı onkogen ve tümör supresör genlerin aksine apoptosizi engeller. Hücreleri oksidan maddelerden koruyarak apoptozisi engellediği düşünülmektedir (13, 21).

Son zamanlarda tanımlanan bir başka gen lokusu da bax olmuştur. Bax'ın alternatif "splicing "ile oluşan iki protein ürünü vardır. Bcl-xL (large) ve bcl-xs (small) . Bunlar, bcl – 2'nin tersine apoptozisi uyarıcı etki yapar. Bcl-xL ve bcl-2 aynı büyüklükte proteindir .Hücrelerin apoptozise gidişini bax / bcl-2 oranlarının düzenlediği sanılmaktadır (13, 21).

P53

Son zamanlarda bir çok kanser türünde özellikle kolon ve karaciğer kanserlerinde önemli rolü olduğu saptanmış bir tümör supresör genidir. 17. kromozomun uzun kolunda yer alır. %80 "missens" mutasyona ve bunun sonucunda yapısal değişikliklere uğrar. Wild –type (normal fonksiyon gören) p53 geni hücrenin apoptozise gidişini kolaylaştırır. Bu genin bir ya da iki allelindeki bozukluk apoptozisi engelleyebilmekte ve hücrenin imortalizasyonu ile sonuçlanabilmektedir (10, 13).

C-myc

Sekizinci kromozom üzerinde yer alır. Normalde DNA' ya bağlanabilen ve hücre siklusunda rol oynayan en az iki proteini kodlamaktadır. Apoptozisteki etkisinin direkt olmaktan çok diğer uyarıların etkisini artırmak şeklinde olduğu söylenmektedir. Bu genin 14. kromozomda bulunan Ig ağır zinciri ile translokasyonu anormal aktivite kazanmasına yol açar. c-myc'in büyüme faktörü ile etkileşimi sonucu apoptoziste rol oynadığı gözlemlenmiştir. Eğer ortamda hem c-myc, hem de uygun büyüme faktörü yoksa hücre kültüründe büyümede duraklama olmakta; c-myc var, büyüme faktörü yoksa apoptozis gelişmekte, her iki faktör de varsa normal proliferasyon olmaktadır. C-myc genindeki bozukluklar diğer genlerin de apoptotik etkisini kolaylaştırıcı etki göstermektedir. Bcl-2 ile c-myc geni arasında böyle sinerjistik bir etki gösterilmiştir (13).

fas

40-50 kDA ağırlığında bir membran proteini olup apoptozis mediatörüdür. Renal tubüleri epitelyal hücreler ve interstisyel fibroblastlar fas reseptörü ya da ligantları salgılayabilir. Renal fas yokluğunda hücrelerin apoptozise gitmeyecekleri öne sürülmüştür. Fas yokluğunda distal tubül epitel hücre ölümü gerçekleşirken proksimal tubül epitelinin etkilenmediği gösterilmiştir. İnterstisyel hücrelerin fibrozis ve proliferasyonu açısından ise bir fark kaydedilmemiştir. Bu da bize fas'ın interstisyel hücre ölümünde yeri olmadığını göstermektedir (13).

Sonuç olarak apoptozis birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynayan bir mekanizmadır. Çeşitli iç ve dış uyaranlar bu mekanizmayı ortaya çıkabilir. Ancak neden ne olursa olsun sonuçta izlenen morfolojik değişiklikler hep aynıdır. Kanser hücrelerinde apoptozisi ortaya çıkarmak son zamanlarda kanser tedavisinde önemli bir amaç olarak belirtilmiştir. Ancak yukarıda belirtildiği gibi etkenlerin çok oluşu zorluk çıkarmaktadır. Eğer varsa eksik olan büyüme faktörünün yerine konması, bazı durumlarda bu faktörlerden bazılarının inhibe edilmesi iyi sonuç verebilir. Ayrıca genetik bozukluklarda gen tedavisi ile sağlam genin hücreye verilmesi ve apoptozisin ortaya çıkması sağlanabilir. Belki de ileride kanser ve diğer bazı hastalıkların apoptozis yoluyla tedavisi mümkün olabilecektir (10, 11, 12, 13).

2.5 : ANTIOKSİDAN AJANLAR

2.5.1 :MAGNEZYUM

Etki mekanizması tam olarak tanımlanamamakla birlikte invitro şartlarda magnezyumun, Ca okzalat ve Ca fosfat kristallerinin oluşumu ve nükleasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bulgunun kliniğe yansması da; Ca okzalat ve Ca fosfat taşı olan hastalarda profilaktik amaçlı $Mg(OH)_2$ kullanımı ile taş hastalığı reküransinin azalması şeklinde görülmüştür (19, 29).

Bu özelliğiyle Mg^{++} , Ca^{++} içerikli taşlarda ilk saptanan inhibitör ajandır. Ancak yine yapılan invitro çalışmalarda yüksek doz $Mg(OH)_2$ yüklemesiyle Ca taşlarında çözünme olmadığı görülmüştür. Yine yapılan deneysel çalışmalarda vitamin B6 yetmezliği ile birlikte hipositratürinin varlığı Mg^{++} eksikliğiyle birleştiğinde daha yüksek oranda taş hastalığı geliştiği gösterilmiştir. Alkali Mg^{++} tuzlarının üriner sitrat atılımını artırıcı etkilerinin olması da bu durumla bağlantılıdır. Diyetle alınan yüksek oranda magnezyumun barsaklardan okzalat emilimini azalttığı da saptanmıştır. Bunun da nedeni barsaklardan emilim esnasında magnezyumun okzalat ile kompetisyona girmesidir (19, 27, 29).

2.5.2 : SİTRAT

Sitrat, Ca tuzları ile çözünebilir kompleksler oluşturarak üriner Ca saturasyonunu azaltır. Daha da önemlisi Ca^{++} tuzlarının kristalleşmesini direk inhibe edici etkileri vardır. İdrarda sitrat düşüklüğünün Ca^{++} taşı oluşumuna katkısı 1930'lardan beri bilinen bir gerçektir (20). %15-63 nefrolityazisli hastada hipositratüri saptanmıştır. Bayanlarda (özellikle premenapozal) erkeklere nazaran daha çok sitrat üretimi görülür. Normalde idrarla atılımı 220 mg/gün civarındadır. Hipositratüri; idrarla 115 mg/gün'den az sitrat atılımı olmasıdır (2, 4).

Hipositratüri etiyojisinde en önemli faktörler; (25)

--Distal RTA

--Kronik diyare

--Tiazid grubu diüretiklerin kullanımı

--Diğer: Diyetle aşırı hayvansal protein alımı,

Yorucu egzersizler,

Aşırı Na alımı,

Aktif İYE,

GİS'den sitrat malabsorbsiyonu

Sitratın in vitro şartlarda Ca okzalit ve Ca fosfat kristalizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir ki bu özelliğini pH 6.5'in üzerinde olduğu alkali ortamda gösterebilmektedir. Sitratın oynadığı ikinci rol ise spesifik olarak kristal oluşum ve agregasyonunu inhibe etmektedir (20, 27).

2.5.3 : VİTAMİN E

Özellikle bitkilerde bol miktarda bulunan vitamin E' nin birden fazla formu olup en yaygın ve güçlü türevi α -tokoferoldür. Kroman halkasından sentezlenir. Günlük gereksinimi erkeklerde 10 mg, kadında 8 mg kadardır. İnsanda emilimi incebarsaklardan yağlarla birlikte olup kanda şilomikron ve diğer β -lipoproteinlere bağlanarak taşınır. Bunun %75'i safra ile glukuronit konjugatları şeklinde atılmaktadır. Metabolitleri kinon yapıları ile beraber dokularda bulunmaktadır (28, 30).

İnsanlarda bilinen temel etkisi antioksidan olmasıdır. Hücre bileşenlerinin moleküler oksijen ve serbest radikaller tarafından enzimatik olmayan oksidasyonundan korumada bir antioksidan olarak rol oynar. Özellikle aşırı derecede doymamış yağ asitleri ile beslenenlerde gözlenen lipid peroksidasyonu neticesinde eritrosit membranlarında frajilite artar ve spur hücreli anemi denilen akkiz hemilitik anemi ortaya çıkar. Vitamin E, selenyum ile birlikte glutatyon peroksidaz enziminin koenzimi olmaları nedeniyle bu durumu engellerler (28, 43).

Aşağı sınıf hayvanlarda vitamin E eksikliği durumunda testiste germinal epitelin dejenerasyonu sonucu sterilite ortaya çıkabilir. Ancak insanlarda sperm motilitesini artırmakla birlikte vitamin E'nin böyle bir etkisi görülmemiştir. Vitamin E eksikliği ayrıca dişilerde fekondasyondan sonra fetusun absorpsiyonuna neden olabilmektedir. Zaten bu özelliklerinden dolayı vitamin E'ye antisterilite vitamini de denmektedir (28, 30).

Tüm vitaminler gibi vitamin E'nin eksikliği de normal büyümeyi engellemekte ve bazen renal tubüler hücrelerin dejenerasyonuna neden olabilmektedir (28 , 43).

2.5.4 : ALLOPURİNOL

Allopurinol, ksantin oksidaz enzimini inhibe etmek suretiyle endojen ürik asit oluşumunu ve dolayısıyla idrar ürik asit düzeyini düşürmektedir. Tüm üriner sistem taşlarının yapısına bakıldığında izole ürik asit taşları ortalama %20 sıklıkta görülmektedir. Bu grup hastaların büyük kısmında altta yatan serum ürik asitini yükselten, myeloproliferatif bir hastalık, gut hastalığı ya da Lesch-Nyan sendromu vardır. Ürik asit kristallerinin taş hastalığının oluşumunda kısmen daha az görülen bu etkilerinin dışında daha önemli rolü, Ca^{++} taşlarına odak teşkili yapmalarıdır. Bu konuda yapılan eski çalışmalarda, hiperürikozürik, normokalsiürik Ca-okzalat taşlı hastalarda günde 3 kez verilen allopurinolün taş oluşumunu ve tekrarlamaları istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (37, 38, 39).

2.5.5 : VERAPAMIL

Kalsiyum kanal blokörü ajanlar grubunda olan Verapamil, bu spesifik etkisi ile birçok klinik ve deneysel çalışmada iskeminin ortaya koyduğu etkileri ortadan kaldırmak amacıyla kullanılmıştır. Bu grupta yer alan ajanlar (verapamil, nifedipin vs.), uygulanmalarını takiben parankimatöz organlarda damar sisteminde ortaya çıkardıkları belirgin vazodilatatör etki ile doku kanlanmasını artırmaktadırlar. Karaciğer, böbrek gibi parankimatöz organlarda gelişebilecek iskemi sonrasında ortama salınan serbest oksijen radikallerinin doku üzerinde ortaya çıkardıkları lipid peroksidasyonu sonucu, zaman bağımlı ve çoğu sefer geri dönüşümsüz hasar, bu ajanlar tarafından reversible duruma getirilebilmekte ve doku hasarı da sınırlanabilmektedir (30, 31, 32).

Bu konu ile ilgili olarak verapamilin böbrekte iskemi sonrası doku koruyucu etkisi bir çok klinik ve deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Bu spesifik etkisi göz önüne alındığı zaman, bu çalışmamızda hiperokzalürinin renal tubüler hücrelerde ortaya çıkardığı direkt toksik etki ve iskeminin muhtemel etkilerini azaltmak ve bu anlamda gelişebilecek apoptotik değişiklikleri sınırlamak için bir antioksidan ajan olarak verapamil de uygulanmıştır.

3. MATERYAL METOD

Bu deneysel çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1 :DENEKLER

Bu çalışmada toplam 70 adet erişkin Yeni Zellanda Albino tipi tavşan kullanıldı. Tavşanların yarısı erkek, yarısı dişi ve ortalama ağırlıkları 1700 ± 350 g idi. Çalışmaya alınan tavşanların yaşı ortalama 10-12 aydı, tüm hayvanlar çalışma öncesi sistemik enfeksiyon ve enfestasyon açısından mikrobiyolojik ve biyokimyasal olarak ayrıntılı değerlendirildi. Hayvanlar beşerli kafeslerde standart diyet ve normal şehir suyu ile beslendiler. Çalışmada kullanılan antioksidan ajanlar hayvanların normal içme suyuna karıştırıldı.

3.2 :ANESTEZİ

Hayvanlar çalışma sürelerinin bitiminde preanestezik olarak tiazin hidroklorür (Rompun enjektabl , Bayer) ve anestezik olarak ketamin hidroklorür (Ketalar flakon, Eczacıbaşı) 10 mg/kg ile uyutulduktan sonra sakrifiye edildi.

3.3 :CERRAHİ GİRİŞİM

Denekler anestezi uygulanmasını takiben supin pozisyonunda tespit edilerek orta hat abdominal bölgeleri traş edildikten sonra Povidon iyot (Betadine solüsyon, Kansuk) ve alkol ile temizlik yapıp steril örtü ile örtüldü. Orta hattın yaklaşık 10 cm vertikal insizyonla karın duvarı geçilip barsak yapıları lateralize edildikten sonra posterior periton sıyrılmak suretiyle böbrekler açığa çıkarıldı ve küçük bir Kelly klempini renal pediküle konarak bilateral nefrektomileri tamamlandı.

Cerrahi ekip 2 kişiden oluşup cerrah ve asistanı primer operasyonu gerçekleştirdi.

3.4 :TAKİP

Tavşanlar , ortam sıcaklığı 20-25 °C olan hayvan laboratuvarındaki herbirinde 5 tavşan olan kafeslere yerleştirildi. Tavşanların içme sularına %1 etilen glikol içecek şekilde hazırlandı. Ayrıca aşağıdaki dozlarda koruyucu ajanlar günde bir kez biberon ile p.o. olarak verildi.

K-sitrat : 1g/kg/gün (Urocit-K 540 mg, Aymed)

Verapamil : 1 mg/kg/gün (İsoptin ampül 5 mg, Knoll)

Mg(OH)₂ : 200 mg/gün (Mg %15, Eczacıbaşı Baxter)

Vitamin E : 50 IU/gün (Evicap yumuşak kapsül 100 IU, Bilim)

Allopurinol : 200 mg/gün (Ürikoliz tablet 300 mg, İlsan)

3.5 : ÇALIŞMA GRUPLARI

Çalışmamızda 6 çalışma grubu ve bir kontrol grubu mevcuttu. Her bir grupta 10 tavşan vardı ve bunlar da takip sürelerine göre 7 gün ve 28 gün olarak iki alt gruba ayrılmaktaydı. Grup I'deki hayvanlara 7 gün süreyle %1'lik etilen glikol içeren su ile birlikte antioksidan ajanlar verilirken grup I0'daki hayvanlar sadece %1'lik etilen glikollü su aldı, herhangi bir antioksidan ajan uygulanmadı (Tablo 2). Grup II'deki hayvanlar ise 28 gün süreyle %1'lik etilen glikollü su ve antioksidan ajanları alırken grup II0'daki hayvanlar sadece etilen glikollü su aldı, herhangi bir koruyucu ajan verilmedi (Tablo 3). Kontrol grubu ise herhangi bir koruyucu ajan ya da hiperokzalürik diyet verilmeksizin sadece distile su alan grup olarak oluşturuldu. Buna göre çalışma grupları şu şekilde sınıflandırıldı.

Tablo 2: Erken dönem (7 gün) gruplarının dağılımı.

Grup I 0	Antioksidan ajan verilmeyen, sadece %1 etilen glikollü su alan grup (n = 5)
Grup I a	%1 etilen glikol + Sitrat alan grup (n = 5)
Grup I b	%1 etilen glikol + Verapamil alan grup (n = 5)
Grup I c	%1 etilen glikol + MgOH alan grup (n = 5)
Grup I d	%1 etilen glikol + Vitamin E alan grup (n = 5)
Grup I e	%1 etilen glikol + Allopurinol alan grup (n = 5)

Tablo 3: Geç dönem (28 gün) gruplarının dağılımı.

Grub II 0	Antioksidan ajan verilmeyen, sadece %1 etilen glikollü su alan grup (n =5)
Grub II a	%1 etilen glikol + Sitrat alan grup (n =5)
Grup II b	%1 etilen glikol + Verapamil alan grup (n =5)
Grup II c	%1 etilen glikol + Mg(OH) ₂ alan grup (n =5)
Grup II d	%1 etilen glikol + Vitamin E alan grup (n =5)
Grup II e	%1 etilen glikol + Allopurinol alan grup (n =5)

3.6 : PATOLOJİK İNCELEME

3.6.1 : Işıık Mikroskopisi

Doku histolojisi ve kristal depozisyonu ışık mikroskopu ile incelendi. Doku rnekleri % 10'luk formalin solüsyonlarında fikse edildikten sonra parafin bloklara gömüldü ve 3-5 µm'lik kesitler alındıktan sonra Hematoksilen-Eozin boyaması yapıldı. Alınan bu doku örnekleri ışık mikroskopu ile 10x40 ve 10x10 büyütme ile incelendi. 1 cm²'lik alanda görülen renal tubüllerdeki kristal birikimi ya da kalsifikasyonuna göre skorlama sistemi oluşturuldu. Buna göre ;

Tablo 4: Kristalizasyon skorlaması.

Kristalizasyon Őiddeti	Kristalizasyon / Kalsifikasyon
Minimal kristalizasyon (+)	1-3 tublde
Orta derecede kristalizasyon (++)	4-7 tublde
İleri derecede kristalizasyon (+++)	7'den fazla tublde

3.6.2 : Apoptotik Değişikliklerin Değerlendirilmesi:

Renal tubüler hücrelerde apoptozisin in situ tespiti; terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT)-mediated dUTP in situ nick and labeling (TUNEL) metodu kullanılarak ApopTag kit (Oncor, Gaithersburg, M.D.) ile tespit edildi. Doku örnekleri %10 formollü solüsyonlarda fikse edilip parafin bloklara gömüldükten sonra 3-5 µm'lik kesitler alındı ve deparafinize edilip rehidratasyona tabi tutuldu ve oda sıcaklığında 20 dakika proteinaz K (200 µg/ml Oncor, Gaithersburg MD) ile inkübe edildi. Daha sonra distile su ile yıkandı ve endojen peroksidaz aktivitesinden arındırmak amaçlı %3'lük H₂O₂ ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Takibinde terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) ve dioksigenin-1 (1-dUTP) ile 37°C'de 1 saat nemlendirmeye tabi tutuldu ve oda sıcaklığında 30 dakika antioksidan- peroksidaz ile reaksiyona uğratıldı. Distile su ile yıkanan doku örnekleri %100 butanol ile dehidrate edildikten sonra Xylene ve Entellan (Merck Scientific Corporation, Fairlacon, N.J.) ile yıkandı.

3.6.3 : Apoptotik değişikliklerin skorlaması

Herbir preparatta 1000 tubüler hücre sayılmak suretiyle bunlarda görülen TUNEL pozitif hücre nükleuslarının yüzdesine göre üç tür skorlama tariflendi. Buna göre sınırd, orta ve şiddetli apoptozis tanımlamaları tablo 5'de verilmiştir.

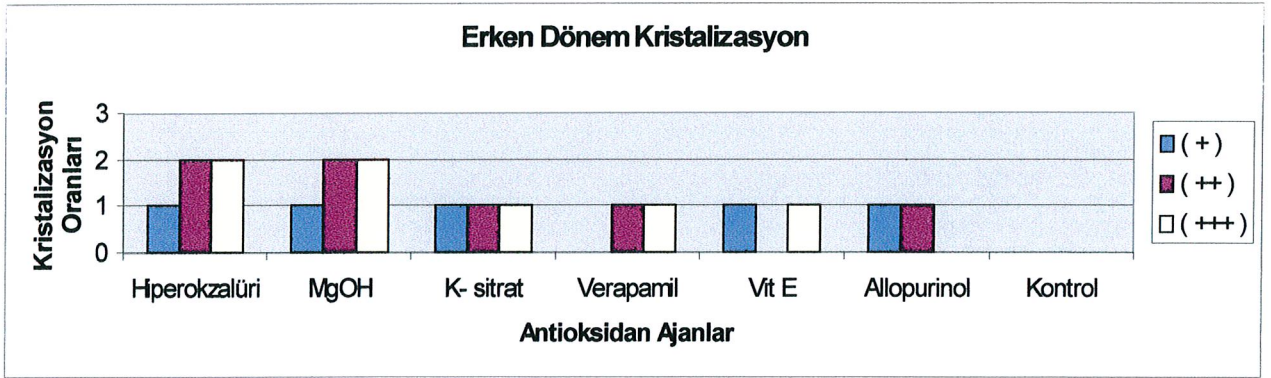
Tablo 5: Apoptozis skorlaması

+	Sınırd, apoptozis	Preparatın %5'inden azında (+) boyanma
++	Orta derecede apoptozis	Preparatın %5-10'unda (+) boyanma
+++	Şiddetli apoptozis	Preparatın %10'undan fazlasında (+) boyanma

3.7 İSTATİKSEL ANALİZ

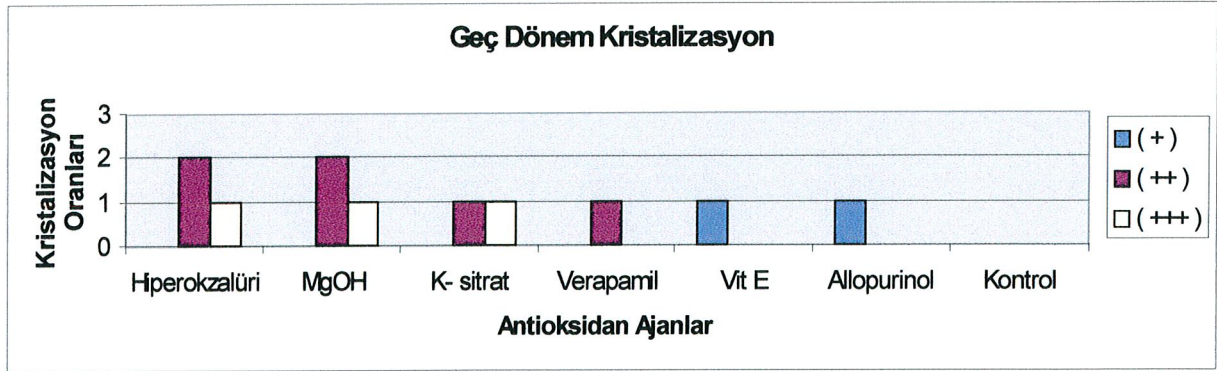
Alınan sonuçlar Windows işletim sisteminde SSPS 8.0 istatistik programında non-parametrik testlerden ‘ ‘ Ki-kare ‘ ‘ kullanılarak değerlendirildi.

Erken dönem sonuçlarına bakıldığında; herhangi bir koruyucu ajan verilmeksizin sadece hiperokzalürik diyet alan grupta deneklerin hepsinde kristalizasyonunun olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık koruyucu ajan alan gruplarda en etkili ajan olarak; allopurinol, vitamin E ve takibinde verapamil gözükmetedir (Resim 1 ve 2). Buna karşılık Mg(OH)₂ ve K-sitrat alan grupta yüksek oranlarda kristalizasyon gözlenmesi Dolayısıyla koruyucu etkileri zayıf olarak görülmektedir (Şekil 1).



Şekil 1: Erken dönemde kristalizasyon oranlarının gruplara göre dağılımı

Geç dönemde ise benzer şekilde sadece hiperokzalürik diyet verilen grupta yüksek oranda kristalizasyon saptanmıştır. Koruyucu ajan uygulanan hayvanlara bakıldığında yine allopurinol ve vitamin E iyi bir koruyucu ajan olarak gözlenmekte, verapamil ve K-sitrat ise erken dönem sonuçlarıyla kıyaslandığında geç dönemde daha iyi bir koruyucu ajan olarak karşımıza çıkmaktadır Buna karşın geç dönemde en fazla kristalizasyon gözlenen grup, Mg(OH)₂ olmuştur (Resim 3)(Şekil 2).



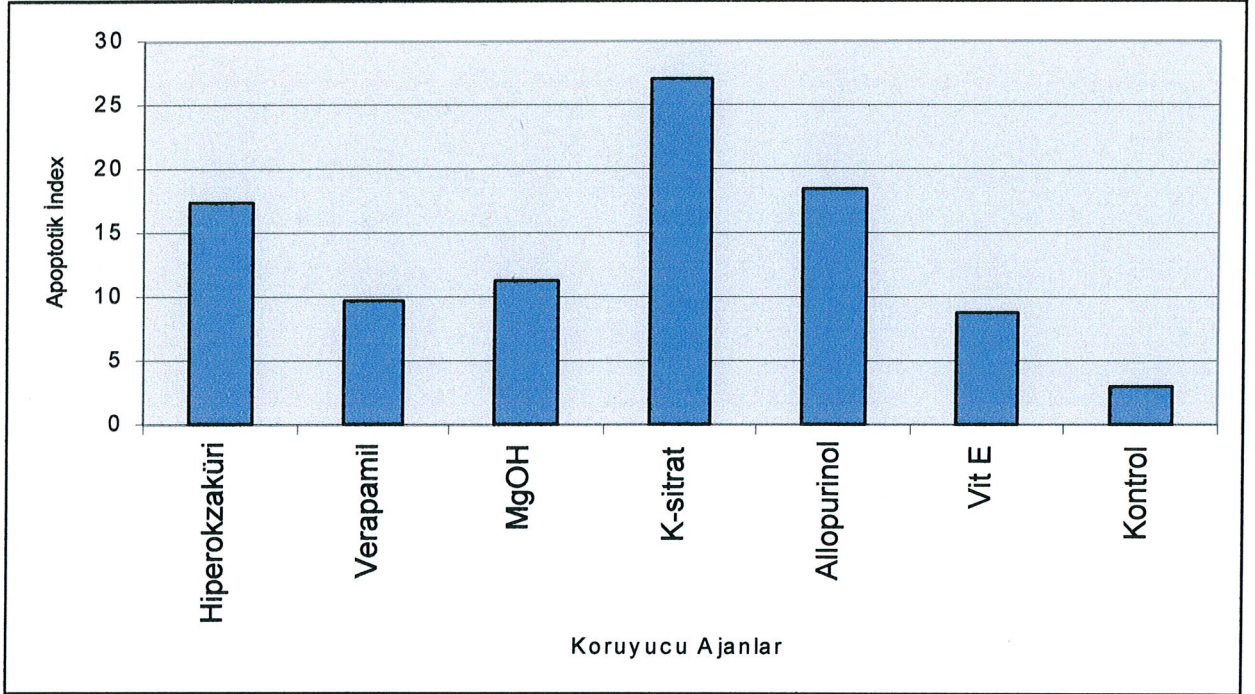
Şekil 2: Geç dönemde kristalizasyon oranlarının gruplara göre dağılımı.

4.2 : ERKEN DÖNEMDE APOPTOTİK DEĞİŞİKLİKLER

Hiperokzalürinin indüklediği kristal birikimiyle apoptotik değişikliklerin oranının korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Tubüler hücrelerdeki apoptotik değişikliklerin hiperokzalürik kristal oluşumuna paralel olarak arttığı saptanmıştır. Diğer yandan tubüllerdeki bu apoptotik değişikliklerin en belirgin olarak distal tubüllerde, daha sonra toplayıcı kanallarda ortaya çıktığı gözlenmiş, buna karşılık en az etkilene kısım proksimal tubüller olmuştur. Gruplara göre saptanan ortalama apoptotik indeks oranları tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7: Erken dönemde görülen apoptotik değişikliklerin gruplara göre dağılımı

Apoptotik İndex (%)	Hiperokal. Diyet	Verapamil	Mg(OH) ₂	K-Sitrat	Allopurinol	Vitamin E	Kontrol
min.-max	15.2-19.8	8.4-10.2	9.1-12.0	24.3-28.6	16.0-19.2	7.5-9.4	2.4-3.2
Ortalama	17.3	9.7	11.2	27.1	18.4	8.7	2.9



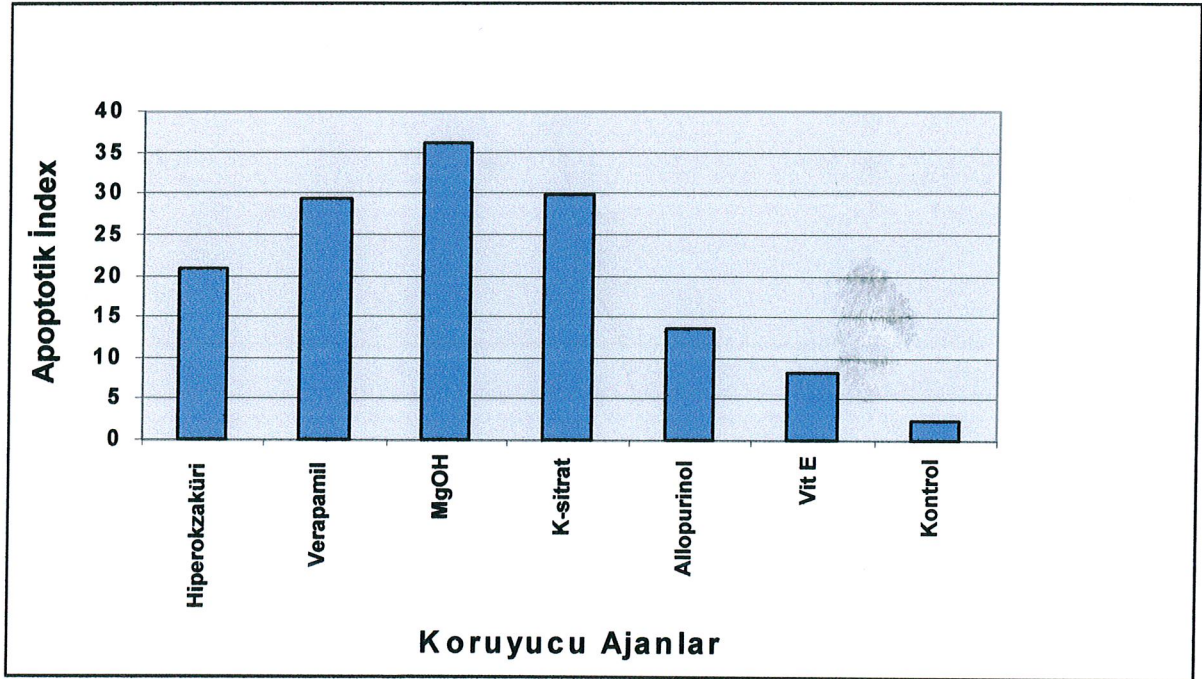
Şekil 3: Erken dönemde gruplara göre ortalama apoptotik indekslerin dağılımı

Apoptotik nükleus boyanması en belirgin olarak K-sitrat alan grupta , takibinde allopurinol alan grupta gözlenmiştir (Resim 5). Bu iki grupta ortalama apoptotik indeks sırasıyla %27.1 ve %18.4 olarak saptanmıştır. Buna karşılık verapamil, Mg(OH)₂ ve vitamin E alan grupta apoptotik indeks sınırda saptanmıştır (Şekil 3). Vitamin E alan grupta apoptotik nükleus boyanması diğer gruplara göre en az olmuştur (Resim 4).

4.3 : Geç Dönemde Apoptotik Değişiklikler :

Tablo 8: Geç dönemde görülen apoptotik değişikliklerin gruplara göre dağılımı.

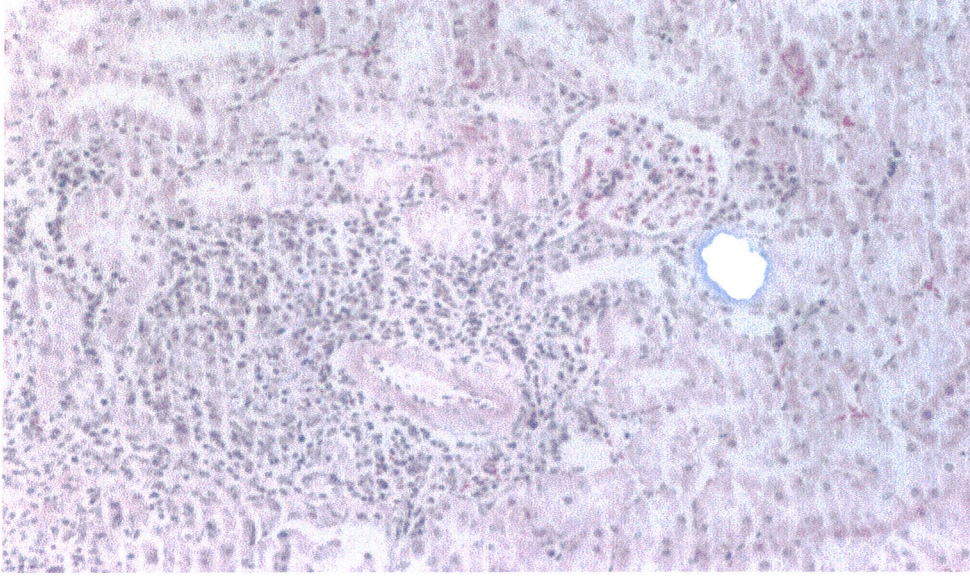
Apoptotik İndex (%)	Hiperokzal. Diyet	Verapamil	Mg(OH) ₂	K-Sitrat	Allopurinol	Vitamin E	Kontrol
min.-max	20.4-21.8	28.2-31.5	34.3-37.0	28.0-30.5	12.4-14.3	9.1-12.2	1.7-2.6
Ortalama	20.9	29.3	36.2	29.7	13.5	8.3	2.4



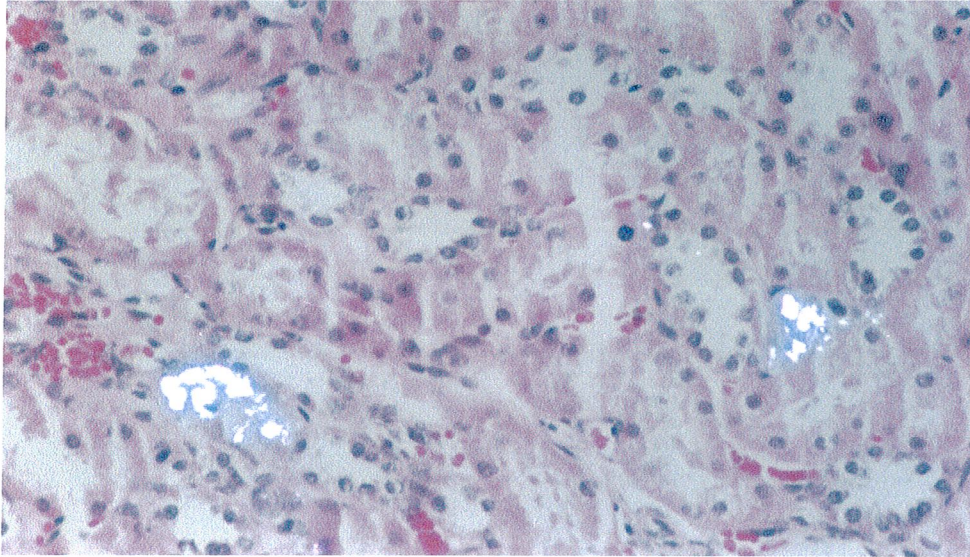
Şekil 4: Geç dönemde gruplara göre ortalama apoptotik indekslerin dağılımı

Diğer tüm gruplarda erken dönemdeki sonuçlarla karşılaştırıldığında apoptotik nukleus boyanmasında artış saptanırken; allopurinol uygulaması yapılan grupta ortalama apoptotik indekse bakıldığında 18.4 'den 13.5'e düştüğü gözlenmiştir (Tablo 8) ($p<0.05$). Vitamin E' de de benzer şekilde çok sınırlı bir apoptotik indeks azalması saptanmış ve 8.7 olan apoptotik indeks 8.3'e düşmüştür (Tablo 8) ($p<0.05$). Buna karşılık, verapamil, K-sitrat ve $Mg(OH)_2$ alan gruplarda ortalama apoptotik indeks değerleri erken dönemle karşılaştırıldığında artmış bulunmaktadır. Geç dönemde en belirgin apoptotik nukleus boyanması $Mg(OH)_2$ alan grupta gözlenmiştir (Resim 6).

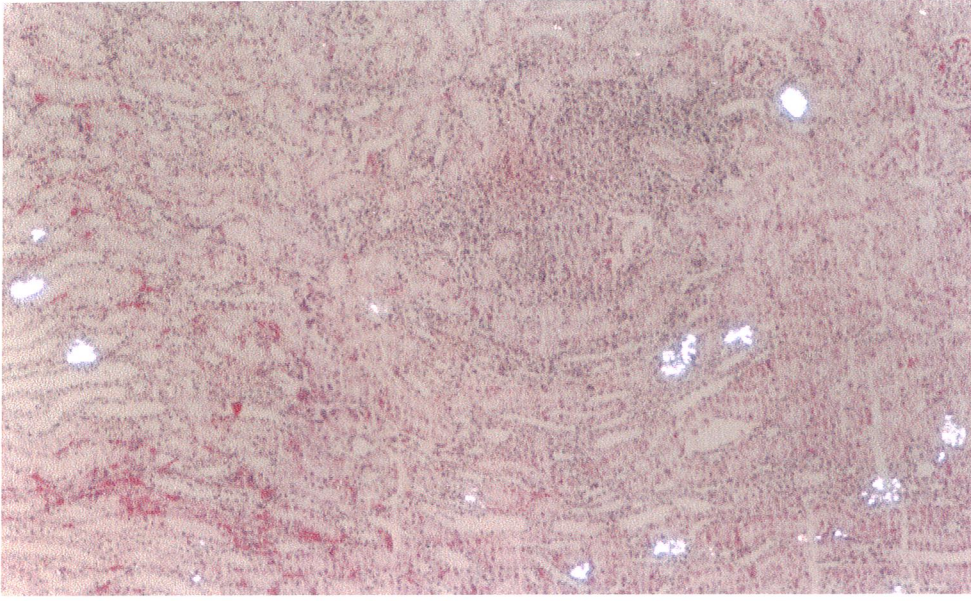
Sonuçta erken ve geç dönem apoptotik değişiklikler değerlendirilip birbiriyle karşılaştırıldığında; allopurinol ve takibinde vitamin E'nin renal tübüllerde ortaya çıkan apoptotik değişiklikleri engellemede veya en azından sınırlamada diğer koruyucu ajanlara göre daha etkili oldukları gözlenmektedir.



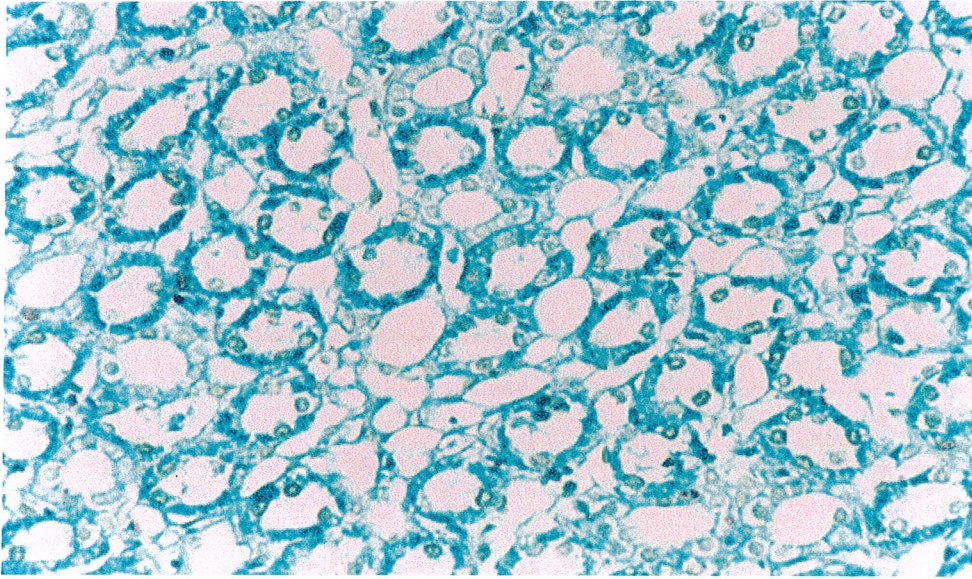
Resim 1: Hafif derecede kristalizasyon gözlenen erken dönemde vitamin E uygulanan gruba ait böbrek örneği (x 20).



Resim 2 : Orta derecede kristalizasyon gözlenen erken dönem allopurinol uygulanan gruba ait böbrek örneği (x 40).



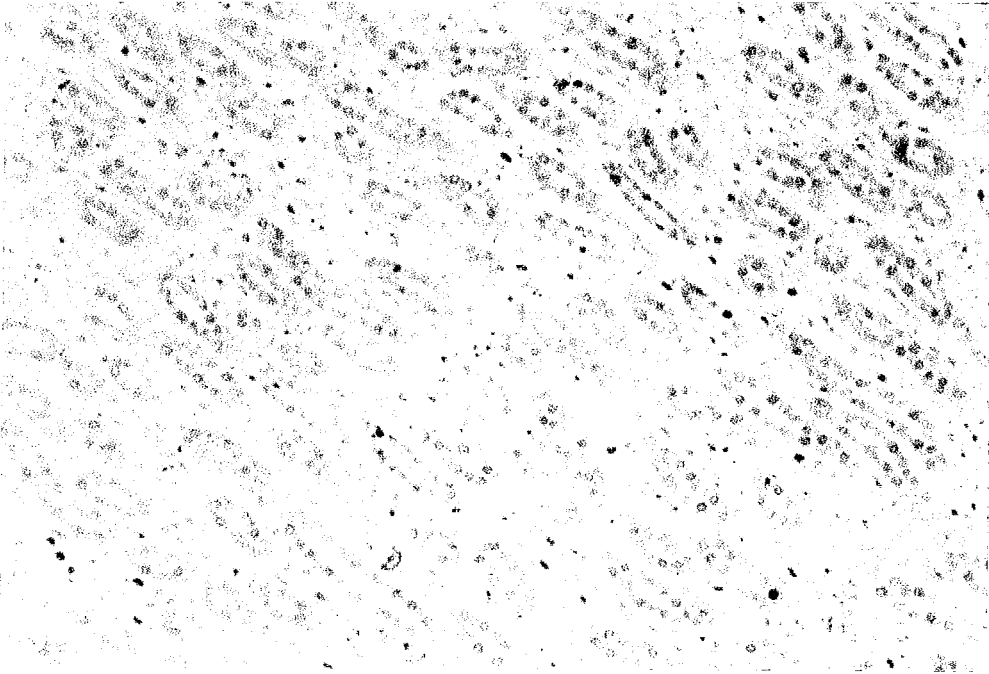
Resim 3: Şiddetli kristalizasyon gözlenen geç dönem Mg(OH)₂ uygulanan gruba ait böbrek örneği (x 20).



Resim 4 : Minimal apoptotik değişikliklerin gözlendiği erken dönem vitamin E alan gruba ait böbrek örneği (x 40).



Resim 5 : Orta derecede apoptotik değişikliklerin gözleendięi geç dönem allopurinol alan gruba ait böbrek örneği (x 40).



Resim 6 : Şiddetli apoptotik değişikliklerin gözleendiği geç dönem $Mg(OH)_2$ alan gruba ait böbrek örneği (x 40).

5. TARTIŞMA

Üriner sistem taş hastalığı yaklaşık 4000 yıldır varlığı bilinen ve hala günümüzde üroloji pratiğinde en sık karşı karşıya gelinen hastalıklardan birisidir. Bu kadar sık görülmesine rağmen üriner sistem taş hastalıkları mevcut çok iyi uygulanan cerrahi tedavi alternatifleri haricinde, gerek olayın fizyopatolojisinin tam olarak aydınlatılmamış olması ve gerekse medikal tedavinin istenen düzeyde başarılı sonuçlar ortaya koyamamış olması nedeniyle üzerinde araştırmaların mutlaka devam etmesi gereken önemli patolojilerden birisidir.

İdiyopatik Ca-okzalat taşı oluşumunda en önemli risk faktörü hiperokzalüridir. Daha önce bu konuda yapılmış deneysel çalışmalarda renal epitelyal hücrelerle Ca-okzalat kristallerinin ya da tek başına okzalat iyonunun etkileşiminin taş hastalığının gelişiminde kritik rolü oynadığı gösterilmiştir. Bu etkileşim neticesi renal epitelyal hücrelerde bazal membran kaybıyla birlikte hücre ölümü ve neticesinde kristal veya iyonların daha kolay birikimi sağlanmaktadır. Hiperokzalürik diyet verilen hayvan modellerinde enzimüri, proteinüri ve membranürinin gösterilmesi bu görüşü desteklemektedir (40, 41, 45).

Biz yaptığımız çalışmada tavşan modelini tercih ettik. Bunun nedeni; tavşanlarla insanlardaki okzalat metabolizmasının benzer şekilde çalışması ve tavşanlarda spontan Ca-okzalat taşı oluşumunun hiç görülmemesidir. Ayrıca renal papilla, korteks ve medulla arasındaki okzalat konsantrasyon gradienti de insan böbreğine benzer şekilde çalışmaktadır ki bu nedenle üriner okzalat konsantrasyonu en yüksek oranda toplayıcı kanallarda ve papillalarda gözlenmektedir (14).

Khan ve ark.; hiperokzalürik diyet verilen deney hayvanlarında hücre hasarının etiopatogenezini araştırdıkları çalışmalarında, hücre ve mitokondri membranında lipit peroksidasyonu neticesinde ortama salınan serbest oksijen radikallerinin hücre hasarı

ortaya çıkardıklarını ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde Scheid ve ark. yaptıkları çalışmalarında, okzalit iyonlarının serbest oksijen radikallerinin salınımını artırdıklarını göstermişlerdir. Diğer yandan tubüler iskeminin de reaktif oksijen radikallerinin salınımını artırdığını da göstermişlerdir. Koul ve ark. da yaptıkları çalışmalarında ; hiperokzalüri oluşturulan deney hayvanlarında c-myc gen ekspresyonu, hücre proliferasyonu ve hücre ölümünün arttığını göstermişlerdir. Bu konuda yapılan benzer çalışmalarda bu hücre ölümünün nekroz şeklinde geliştiği öne sürülmüşse de son yapılan çalışmalarda bunun klasik nekroz şeklinde değil de programlanmış hücre ölümü şeklinde geliştiği ortaya konmuştur (14, 23, 46 , 49).

Daha önce yapılan çalışmalarda hiperokzalürinin neden olduğu renal parankimdeki kristal birikimi ve renal tubüler epitelde ortaya çıkan apoptotik değişiklikleri önlemeye ya da azaltmaya yönelik koruyucu birtakım ajanlar araştırılmıştır. Sarıca ve ark. ; hiperokzalürik diyet verilen tavşan modelinde ESWL sonrası ortaya çıkan renal tubüler hasarın verapamil ve nifedipin ile azaltılabileceğini göstermişlerdir (43, 47).

ESWL sonrası taş rekürsini azaltmaya yönelik yapılan çalışmalarda; K-sitrat, allopurinol ve vitamin E gibi antioksidan ajanların serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkardığı renal hasarlanmayı azalttıkları gösterilmiştir (44, 47).

Mg, invitro şartlarda Ca-okzalit kristalizasyonunun güçlü bir inhibitörü olmasına karşın invivo şartlarda Ca-fosfat kristalizasyonunu ancak % 20 oranında azaltabilmektedir. Yapılan çalışmalarda diyetle alınan Mg'un eksikliği durumunda idrar okzalit düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Bunun da nedeni Mg'un barsaklardan emilimi esnasında okzalit ile kompetisyona girmesidir. Ogawa ve ark., yaptıkları çalışmalarında hiperokzalürik diyet verilen ratlarda Mg tuzlarının Ca-okzalit taşı oluşumunu inhibe edici etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Aynı çalışmada, kullanılan Mg tuzlarının idrarı alkalileştirmek suretiyle üriner sitrat düzeyini de artırdıkları ve dolayısıyla taş oluşumu açısından sitrat ile sinerjistik etki yaptıkları gösterilmiştir (19, 27).

Oldukça kuvvetli bir antioksidan ajan olan vitamin E'nin yapılan değişik çalışmalarda, parankimatöz organlarda, serbest oksijen radikallerinin etkilerinden koruduğu gösterilmiştir. Vitamin E eksikliği durumunda, testis ve böbrek gibi organlarda lipit peroksidaz birikmekte ve hücre membranında lipit peroksidasyonu neticesinde geçirgenlik artmakta ve hücre içi organellerde disintegrasyon ve sonunda hücrenin kaybına neden olmaktadır. Bizim çalışmamızda vitamin E'nin, hiperokzalürinin neden olduğu renal tubüler epitelde ortaya çıkan apoptotik değişiklikleri engellediği ortaya konmuştur (44 , 47).

Sitratın invitro şartlarda Ca-okzalat ve Ca-fosfat kristalizasyonunu engellediği gösterilmiştir. İdrarda bulunan sitrat, serbest Ca iyon aktivitesini azaltmaktadır. Ancak bu etki pH bağımlı olup maksimum etki pH 6.5'in üzerinde görülmektedir. Neticede serbest Ca iyon aktivitesinde azalma olması, Ca-okzalat ve Ca-fosfat kompleksinin oluşumu azalmaktadır. Sitratın oynadığı diğer 2. önemli rol ise; kristal oluşumu ve agregasyonu inhibe etmesidir. Sitrat, Ca-fosfat kristal oluşumunun majör inhibitörü iken Ca-okzalat kristalleri için bu etki daha zayıftır. Ancak yine de fosfositrat ve sitrat-metal kompleksleri Ca-okzalat kristalizasyonunun güçlü bir inhibitörüdür. Pak; K-sitrat ile uzun dönem takip neticesinde idrar pH ve sitrat düzeylerinde artış ve hipositratürik Ca taşları ve ürik asit taşlarında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma saptamıştır. Ogawa ise hiperokzalürik diyet verilen ratlarda K-sitratın, hiperokzalüriyi ve uzun dönemde kristalizasyon ve taş oluşumunu azalttığını göstermiştir (16, 18, 20, 37, 39).

Allopurinol, ksantin oksidaz enzimini inhibe ederek Ca- okzalat kristallerine nükleus görevi gören ürik asitin endojen üretimini azaltmak suretiyle taş oluşumunu engeller. Allopurinol, yaklaşık son 20 yıldır Ca-okzalat taşı metaflaksisinde kullanılmaktadır. Yapılan pekçok çalışmada allopurinolün Ca-okzalat taşı rekürrens oranlarını azalttığı gösterilmiştir. Ancak bu etkisi hiperürükozurik hastalarda daha belirgin görülmekle birlikte normal ürik asit atılımı gösteren hastalarda da profilaktik amaçla kullanıldığında rekürrens oranlarını azalttığı gösterilmiştir (41, 42, 47).

Biz yaptığımız çalışmada; hiperokzalürinin indüklediği renal tubüler hücre apoptozisinin değişik antioksidan ajanlarla engellenmesini araştırdık. Hayvan modeli olarak tavşan kullandığımız çalışmamızda %1'lik etilen glikol içeren su ile beslenen hayvanların böbreklerinde ışık mikroskopi ile saptanan kristal depolanması izlendi. Çalışmanın diğer ana başlığı olan renal tubüler hücre apoptozisi ise TUNEL yöntemi ile tespit edildi. Renal tubüllerde ortaya çıkan kristalizasyon ve apoptotik değişikliklerin koruyucu antioksidan ajanlar ile engellenmesi erken (1 hafta) ve geç (1 ay) dönemde ayrı ayrı saptandı ve karşılaştırıldı.

Kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilen sadece distile su ile beslenen grupta kristalizasyon ya da apoptotik değişiklik saptanmadı. Erken dönemde ışık mikroskopisi ile gözlenen kristalizasyon oranlarına bakıldığında en şiddetli kristalizasyon, Mg(OH)₂ ve K- sitrat alan grupta, daha sonra da verapamil alan grupta izlenmiştir. Erken dönemde en az kristalizasyon oranı allopurinol ve vitamin E alan grupta izlenmiştir.

Geç dönemde kristalizasyon oranlarına bakıldığında benzer şekilde en az kristalizasyon allopurinol ve vitamin E alan grupta saptanmıştır. K- sitrat ve verapamil alan grupta kristalizasyon erken dönemle karşılaştırıldığında azalmış görülmektedir. Neticede renal tubüllerde kristal birikiminin engellenmesi açısından erken ve geç dönemde allopurinol ve vitamin E en etkin iki ajan olarak gözlenmiştir.

Erken dönemde apoptotik nükleus boyanması, vitamin E ve allopurinol alan grupta sırasıyla % 8.7 ve %18.4 olarak saptandı. Geç dönemde ise benzer şekilde sırasıyla %8.3 ve %13.5 oranında apoptotik nükleus boyanması izlendi. Bu değerler, verapamil, K-sitrat ve Mg(OH)₂ alan gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede bu iki ajanın renal tubüler hücrelerde ortaya çıkan apoptotik değişiklikleri engellemek bakımından daha etkili koruyucu etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur.

6. SONUÇ :

Elde ettiğimiz veriler ve literatür bulguları ışığında, hiperokzalüriye bağlı olarak gelişen apoptotik değişikliklerin ortaya koyduğu tubüler hücrelerdeki hasarın taş oluşumunda çok önemli bir rol oynadığı açıktır. Bu patolojinin etkilerinin sınırlanması yada tamamen ortadan kaldırılmasına yönelik medikal tedavi hem taş oluşumunu sınırlayacak hem de sonradan gelişebilecek nüks durumlarına engel olabilecektir. Elde ettiğimiz veriler, antioksidan özelliği taşıyan bazı ajanların (allopurinol ve vitamin E) apoptozis üzerine olan sınırlayıcı etkileri nedeniyle bu amaçla klinik uygulamalarda kullanılacaklarına işaret etmektedir. Ancak bu konuda daha başka antioksidan ajanları ve değişik parametreleri içeren prospektif kontrollü çalışmaların gerekli olduğu da açıktır.

7. ÖZET

Hiperokzalüri, idiyopatik Ca-okzalat taşı gelişiminde en önemli risk faktörüdür. Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda, Ca-okzalat kristallerinin ya da tek başına okzalat iyonlarının renal epitel hücreleri ile etkileşiminin üriner taş oluşumunda kritik rolü oynadığı gösterilmiştir. Bu etkileşim neticesinde renal tubül hücrelerinde birtakım morfolojik değişiklikler gelişmekte ve sonuçta hücre kaybı oluşmaktadır. Yapılan ilk çalışmalarda bu hücre kaybının nekroz şeklinde olduğu düşünülmele birlikte son çalışmalarda bunun klasik nekroz şeklinde değil de, programlanmış hücre ölümü şeklinde olduğu gösterilmiştir.

Bu deneysel çalışmada, hayvan modelinde hiperokzalüriye bağlı gelişen renal tubüler hücre apoptozisinin koruyucu birtakım ajanlar (allopurinol, verapamil, K-sitrat, vitamin E ve $Mg(OH)_2$) ile engellenmesi ya da sınırlandırılması hedefledik. Hayvan modeli olarak tavşanı seçtiğimiz çalışmamızda, deneklere erken (7 gün) ve geç (28 gün) dönemde %1'lik etilen glikollü su ile birlikte yukarıda belirtilen antioksidan ajanlar verildi. Sonuç olarak sözkonusu ajanlardan allopurinol ve vitamin E'nin, gerek kristal birikimini, gerekse apoptotik değişiklikleri engelleme ya da sınırlama açısından diğer koruyucu ajanlara göre daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır.

8. SUMMARY

Hyperoxaluria is the main risk factor for human idiopathic calcium oxalate stone formation and induction of hyperoxaluria is essential for the development of Ca-oxalate urolithiasis. Related with this subject, the between renal epithelial cells and Ca-oxalate crystals add/or oxalate ions play a critical role in the formation of urinary calculi. Although crystals themselves can cause cell damage, the cause and effect relationship between injury and crystal has not yet been elucidated. Both clinical and experimental studies have suggested that renal tubular epithelium is the major target for oxalate induced injury and sustained hyperoxaluria and Ca-oxalate crystal formation/ deposition may result in injury to the renal tubular cells.

Taking the results of recent studies, oxalate exposure has been found to produce a variety of changes in renal epithelial cell morphology and function including increased cellular proliferation and at elevated concentrations, cell death. Again, induction of hyperoxaluria has been found to be associated with necrosis and cell injury in renal tubular epithelium. Rather these and other studies demonstrate that oxalate interactions with renal epithelial cells elicits a programmed sequence of events that can lead to cell proliferation or cell death.

In this present animal study, it was our goal to evaluate the protective effects of some definite agents (Vitamin E, $Mg(OH)_2$, Allopurinol, Potassium citrate, Verapamil) on the presence and degree of apoptotic changes in renal tubular epithelial cells, following hyperoxaluric diet induction in rabbit model. Allopurinol and vitamin E seemed to exhibit limited inhibitory effect during both overall follow-up examination. In summary, pretreatment of animals with vitamin E and allopurinol provided a significant protection from calcium oxalate deposition and apoptosis in tubular cells.

KAYNAKLAR

- 1- Dere F. Anatomi Ders Kitabı (2. Baskı), Okullar Pazarı Kitapevi, 1990 : 655-656
- 2- Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N. Temel Üroloji, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (1. Baskı), Güneş Kitapevi, 1998 : 3-5
- 3- Tanagho E, Mc.Anindo J. Smith's General Urology, (14.^{ed}), London. Prentice – Hall International Inc., 1995 : 3-4
- 4- Walsh P, Retik A, Vaughan D, Wein A. Campbell's Urology (7.^{ed}) Philadelphia, W.B. Saunders Com. 1985 : 528-560
- 5- Guyton A. Textbook of Medical Physilology (7.^{ed}) W.B. Saunders Comp., 1986 : 569-590
- 6- Jenkins AD. Adult and Pediatric Urology (3.^{ed}), St. Louis Mosley Year Book, 1996 : 461-505
- 7- Guyton AC. Tıbbi Fizyoloji. H. Nobel Tıp Kitabevi, 1989 : 34-35
- 8- Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N. Temel Üroloji, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (1. Baskı), 1998 : 561-604
- 9- Cotran S, Kumar V, Collins T. Obstructive Uropathy, Pathology Basis of Disease, (6.^{ed}), Philadelphia, W.B. Saunders Com., 1998 : 988-989
- 10- Whyllie A, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol. 1980; 68: 251-305
- 11- Cummings MC, Winterford C, Walker N. Apoptosis. Histol. for Pathol. 1997; 1: 3-8

- 12- Kerr JFR, Winterford C, Harmon B. Apoptosis. *Science* 1993; 6: 2013-2023
- 13- Mundy AR, Fitzpatrick J, Neal ED, Gerorge NR. *Scientific Basis of Urology*. Issis MM, Oxford-UK, 1999: 301-319
- 14- Khan SR, Haccket RL. Calcium oxalate urolithiazis in the rat: Is it a model for human stone disease? *Scanning electron microscopy* 1995; 2: 759-774
- 15- Hodgingson A. Oxalic acid in biology and medicine. *J. Nutrition* 1997; 108: 1115-1161
- 16- Ogawa Y, Miyazoto T, Hatano T. Oxalate and Urinary Stones. *World J. Surgery* 2000; 24: 1154-1159
- 17- Smith LH. Solution and Solute. *Endocrinology and Metabolism*. 1990; 19: 767-772
- 18- Balaji KC, Menon M. Mechanism of stone formation. *Urol. Clin. North Am.* 1997; 24: 1-10
- 19- Ogawa Y, Yamaguchi K, Marazumi M. Efects of magnesium salts in preventing experimental oxalate urolithiasis in rats. *J. Urol.* 2001; 144: 27-31
- 20- Ogawa Y, Tanako T, Yamaguchi K. Efects of sodium citrate and citric acid in preventing expermental calcium oxalate urolithiasis in rats. *Act. Urology* 1987; 33: 21-26
- 21- Chevalier RL, Thornhill BA, Wolstenholme JT. Renal apoptosis and clusterin following ureteral obstruction: the role of maturation. *J. Urol.* 1996; 156; 1474-1479
- 22- Cardillo M, Berchem G, Tarkington MA, Krajewski S, Reed JC et al. Resistance to apoptosis and up regulation of bcl-2 in benign prostatic hyperplasia after androgen deprivation. *J. Urol.* 1997; 158: 212-216
- 23- Koul H, Kenington L, Nair G, Honeyman T. Oxalate induced inititation of DNA synntesis in LLC-PK1 cells, a line of renal epithelial cells. *Biochem Biophys. Res. Comm.* 1994; 205: 1632

- 24- Ertürk E, Kiernon M, Suzan R. Clinical association with urinary GAG and urolithiasis. *Urology*. 2002; 59: 495-499
- 25- Siener R, Hesse A. The effects of different diets on urine composition and risk of calcium oxalate crystallisation in healthy subjects. *Europ. Urol.* 2002; 42: 289-296
- 26- Drongelen VJ, Kiemeney L, Debruyne F. Impact of urometabolic evaluation on prevention of urolithiasis. *Urology* 1998; 52: 384-391
- 27- Yagisawa T, Chandhoke P, Fon J. Metabolic risk factors in patients with first time and recurrent formations as determined by comprehensive metabolic evaluation. *Urology* 1998; 52: 750-755
- 28- Guyton A. *Tıbbi Fizyoloji (7. Baskı), Nobel Tıp Kitapevi/1986; 73-1256-1257* ^{Yaman yer.}
- 29- Reungjui S, Prasongwatuna V, Premgamone A, Tasukhawang P. Magnesium status of patients with renal stones and its effects on urinary citrate excretion. *B. J. Urol. Int.* 2002; 90: 635-644
- 30- Champell PC, Harvey AR. *Biochemistry (2. Ed.), Oxford-UK.* 1997; 27: 340
- 31- Yaman Ö, Sarıca K, Özer G, Sovgür T. Protective effects of verapamil on renal tissue during shock wave application in rabbit model. *J. Endourol.* 1996; 10: 329-333
- 32- Strohmaier W, Koch J, Balk KN, Wilbert DM. Limitation of shock wave induced renal tubular dysfunction by nifedipin. *Europ. Urol.* 1994; 25: 99-104
- 33- Strohmaier W, Bichler KH, Wilbert DM, Balk KN. Protective effects of verapamil on shock wave induced renal tubular dysfunction. *J. Urol.* 1993; 150: 27-29
- 34- Strohmaier W, Abenius A, Billes J, Grossman T ^(et all.) Verapamil limits shock wave induced renal tubular damage in vivo. *J. Endourol.* 1994; 8: 269-273
- 35- Fegan JE, Husman DA, Alexander BS, Feagin B, Preminger GM. Preservation of renal architecture after extracorporeal shock wave lithotripsy. *J. Endourol.* 1991; 5: 273-276

- 36- Sarica K, Özer E, Özer G, Soygür T. Preservation of shock wave induced renal histologic changes by dermatan sulphate. *Urology* 1997; 49: 145-150
- 37- Walsh p, Retik A, Voughan D, Wein A. *Champhell's Urology*. WB saunders Comp. 1985; 91: 2661-2773
- 38- Garcia A, Sanuedra L, Muros M. Urinary analysis of nephrolithiasis markers. *J. Chromatography B*. 2002; 781: 433-455
- 39- Bihl G, Meyers A. Recurrent renal stone disease; advances in pathogenesis and clinical management. *The Lancet* 2001; 358: 651-656
- 40- Khan S. Pathogenesis of oxalate urolithiasis; Lessons from experimental studies with rats. *Am. J. Kidney Disease* 1991; 17: 398-401
- 41- Tiselius HG, Larsson L, Hellgren E, Allison K. Clinical results of allopurinol treatment in prevention of calcium oxalate stone formation. *J. Urol.* 1986; 136: 50-53
- 42- Hofbauer J, Zechner O. Impact of allopurinol treatment on the prevention of hyperuricosuric calcium oxalate lithiasis. *Europ. Urol.* 1988; 15: 227-229
- 43- Sarica K, Bakır K, Yağcı F. Limitation of possible enhanced crystal deposition by verapamil in renal parenchyma after ESWL application in rabbit model. *J. Endourol.* 1999; 13: 343-346
- 44- Biri H, Öztürk HS, Büyükoçak S, Kaçmaz M. Antioxidant defence potential of rabbit renal tissues after ESWL: Protective effect of antioxidant vitamins. *Nephron* 1998;79: 181-183
- 45- Khan SR, Shevock PN, Hackett RL. Urinary enzymes and calcium oxalate urolithiasis. *J. Urol.* 1989; 142: 846-851
- 46- Scheid CR, Koul H, Kennington L. Oxalate induced damage to renal tubular cells. *Scanning Microscopy* 1995; 9: 1097-1101