



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL ÜRİNER SİSTEM TAŞ HASTALIĞI MODELİNDE
MELATONİN'İN KORUYUCU ETKİLERİ**

Dr. TARIK EMRE ŞENER

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2016





T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL ÜRİNER SİSTEM TAŞ HASTALIĞI MODELİNDE
MELATONİN'İN KORUYUCU ETKİLERİ**

Dr. TARIK EMRE ŞENER

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. CEM AKBAL

İSTANBUL 2016

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca cerrahi bilgilerini ve akademik birikimlerini benimle paylaşan değerli Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ferruh Şimşek'e,

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez hazırlığım boyunca her zaman ve her konuda desteğini gördüğüm değerli danışman hocam Prof. Dr. Cem Akbal'a,

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığımız Anabilim Dalımız değerli hocaları; Prof. Dr. N. Levent Türkeri, Prof. Dr. Tufan Tarcan, Prof. Dr. H. Kamil Çam, Prof. Dr. A. Rahmi Onur, Doç. Dr. Cevdet Kaya, Yard. Doç. Dr. Yılören Tanıdır, Yard. Doç. Dr. İlker Tinay, Uzm. Dr. Çağrı Akın Şekerci'ye,

Asistanlık sürecini birlikte geçirdiğimiz arkadaşlarım Dr. Ahmet Şahan, Dr. Ferhat Talibzade, Dr. Bahadır Şahin, Dr. M. Kazım Asutay, Dr. Asgar Garayev, Dr. Muhammed Sulukaya ve Dr. Elnur Allahverdiyev'e,

Tez çalışmamın histolojik bulgularının değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Şule Çetinel'e, biyokimyasal parametrelerinin incelenmesinde gösterdiği destekten dolayı Doç. Dr. Özge Çevik'e,

Bana attığım her adımda destek olan, hayatıma sevgi, huzur ve renk katan sevgili eşim Av. Ferhan Şener'e,

Beni büyütüp bugüne gelmemi sağlayan, bana ahlaki ve akademik değerler katan sevgili annem Prof. Dr. Göksel Şener'e,

Hekimlik mesleğine saygı duymamı sağlayan ve hayattaki her adımda fikirleri ve öğütleriyle bana yol göstermiş olan, rahmetle andığım sevgili dedem Emekli Tabip Albay Dr. Osman Muratoğlu'na,

Bana duyguları güven, sevgi ve saygı için tüm aileme,

şükranlarımı sunmayı bir borç biliyorum.

Dr. Tarık Emre Şener

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tarık Emre ŞENER

Deneyisel Üriner Sistem Taş Hastalığı Modelinde Melatoninin Koruyucu Etkileri

Öğrencinin Adı: Tarık Emre ŞENER

Danışmanı: Prof. Dr. Cem AKBAL

Anabilim Dalı: Üroloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Üriner sistem taş hastalığının sık görülmesi ve sık tekrarlaması nedeniyle önleyici ve tedavi edici stratejiler geliştirilmeli ve düzenlenmelidir. Oksidatif stres, üriner sistemde taş oluşumuna ve birikimine aracılık eden mekanizmalardan biridir. Bu çalışmada, güçlü bir antioksidan olan melatoninin taş oluşumunu engelleyici ve taşla bağlı hasara karşı tedavi edici etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Yaklaşık 3 aylık erkek, 250-300 gr ağırlığında 32 adet Wistar albino sıçan randomize edilerek eşit sayıda olmak üzere (n=8) kontrol (taşıyıcı uygulamalı), etilen glikol (EG), melatonin ön tedavili EG (Mel + EG + Mel) ve melatonin tedavili EG (EG + Mel) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Taş hastalığı modeli oluşturulması için sıçanlara %0.75 EG içeren içme suyu 8 hafta süre ile verildi. EG + Melatonin ön uygulamalı grupta melatonin EG ile eş zamanlı başlanarak toplam 8 hafta, EG+Melatonin tedavili grupta ise 8 hafta EG verilirken 4. haftadan itibaren melatonin 10 mg/kg ip olarak 4 hafta boyunca uygulandı. Çalışma sonunda hayvanlar metabolik kafeslere alındı ve idrarda kalsiyum, oksalat, sitrat ve kreatinin tayinleri için 24 saatlik idrar örnekleri toplandı. Ardından eter anestezisi altında intrakardiyak kan örnekleri alınan hayvanlar dekapite edildi ve böbrek dokuları alındı. Kan örneklerinde osteopontin ve N-asetil-β-glukozaminidaz tayinleri, böbrek dokularında ise histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler ile glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), superoksid dismutaz (SOD), myeloperoksidaz (MPO), kaspaz-3, oksidatif DNA hasarı (8-OHdG), ve Matriks Metaloproteinaz-9 (MMP-9) tayinleri yapıldı.

Bulgular: EG uygulaması kalsiyum düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltmış, Mel + EG + Mel grubunda kontrol değerlere yaklaştı. EG grubunda kontrole göre artan oksalat, sitrat ve kreatinin düzeyleri ise Mel + EG + Mel grubunda anlamlı olarak düzeldi. EG + Mel grubunda idrar parametreleri, EG grubuyla kıyaslandığında anlamlı düzelme göstermedi. Böbrek dokusunda oksidatif hasarın göstergesi olan MDA, MPO, 8-OHdG, kaspaz aktivitesi ve iNOS ve MMP-9 anlamlı olarak arttı.. Ön uygulamalı melatonin grubunda bu değişiklikler geri çevrilirken EG + Mel grubunda GSH düzeyleri ve SOD aktivitesi dışındaki parametrelerde düzelme izlendi. Histolojik bulgular da biyokimyasal bulguları destekledi.

Sonuç: Melatoninin güçlü bir antioksidan madde olarak üriner sistem taş hastalığının oluşumunu engellediği ve taş oluşmuş böbrek dokusunda, böbrek dokusunu taşa bağlı hasara karşı koruduğu gösterildi. Bu bulgular, melatoninin taş hastalarındaki klinik kullanımında yeni bir alternatif yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: etilen glikol, melatonin, oksidatif DNA hasarı, N-asetil-β-glukozaminidaz, osteopontin

Protective Effects of Melatonin in Experimental Urinary Stone Disease Model in Rats

Student's Name: Tarık Emre ŞENER

Supervisor: Prof. Dr. Cem AKBAL

Department: Urology

SUMMARY

Introduction: Urinary system stone disease (USSD) has high incidence and recurrence rates; thus, prevention and treatment strategies should be optimized. Oxidative process is one of the key contributors of crystal adhesion and aggregation that leads to stone formation. In this study, we evaluated the preventive and curative effects of melatonin (Mel), an anti-oxidant agent, on USSD in rats.

Materials and Methods: Thirty-two Wistar albino rats of 3 months-old, weighting between 250-300 gr, were randomized and divided into 4 groups; vehicle administered control, ethylene glycol (EG), EG + preventive M (Mel + EG + Mel), EG + curative Mel (EG+ Mel) groups. USSD was induced by adding 0.75% EG to drinking water of rats for 8 weeks. Melatonin is given at a dose of 10 mg/kg ip with EG, from day 1 in preventive Mel group along with EG during 8 weeks while in curative Mel group Mel is given after 1 month of EG and continued along with EG until the end of the 8th week. At the end of the experiment, 24-hours urine was collected and rats were decapitated for blood and tissue collection. In blood samples N-acetyl- β -glucosaminidase and osteopontin levels, in tissue samples along with histopathological and biochemical analyses, glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase (MPO), caspase-3, oxidative DNA damage (8-OHdG), and metalloproteinase-9 (MMP-9) levels were measured.

Results: EG administration decreased calcium, citrate and creatinine levels and increased oxalate levels in urine samples of rats compared to control group whereas curative and preventive Mel reversed these parameters back to control levels, latter being more significant. Oxidative damage indicators such as MDA, MPO, 8-OHdG, caspase-3 activities and iNOS and MMP-9 levels were significantly increased in EG group. In preventive M group all these parameters were reversed whereas in curative Mel group all the parameters except GSH and SOD levels were back to control levels. Histopathological analyses were in concordance with biochemical analyses.

Conclusion: Melatonin protects against renal tubular cell injury in USSD and against de-novo stone formation. These findings show that melatonin can present a new alternative approach towards USSD.

Keywords: ethylene glycol, melatonin, oxidative DNA damage, N-acetyl- β -glucosaminidase, osteopontin

SİMGELER VE KISALTMALAR

ÜSTH: Üriner sistem taş hastalığı

EG: Etilen glikol

Mel: Melatonin

MDA: Malondialdehit

MPO: Myeloperoksidaz

GSH: Glutasyon

RTA: Renal tübüler asidoz

KBY: Kronik böbrek yetmezliği

CaOx: Kalsiyum oksalat

ROT: Reaktif oksijen türevleri

PTH: Parathormon

OPN: Osteopontin

MCP: Makrofaj kemoatraktan protein

NOS: Nitrik oksit sentaz

SOD: Süperoksit dismutaz

CAT: Katalaz

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

8-OHdG: 8-hidroksideoksiguanozin

OS: Oksidatif stress

ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim

TBARS: Tiobarbitürik aside duyarlı maddeler

PG: Prostaglandin

NAG: N-asetil- β -glukozaminidaz

NAT: N-asetiltransferaz



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfalar</u>
Önsöz	i
Beyan	ii
Özet	iii
İngilizce Özet	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
İçindekiler	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Taş Oluşum Mekanizmaları	3
2.1.1. Hiperkalsiüri	5
2.1.1.1. Absorptif hiperkalsiüri	5
2.1.1.2. Renal hiperkalsiüri	6
2.1.1.3. Rezorptif hiperkalsiüri	6
2.1.1.4. Hiperkalsiürinin diğer nedenleri	6
2.1.2. Hiperoksalüri	6
2.1.2.1. Primer hiperoksalüri	7
2.1.2.2. Enterik hiperoksalüri	7
2.1.3. Hiperürikozüri	7
2.1.4. Hipositratüri	7
2.1.5. Düşük idrar pH'sı	8

2.1.6. Renal tübüler asidoz	8
2.1.7. Hipomagnezri	8
2.2. Taş Oluşumunda Hüresel Değişiklikler	8
2.3. Etilen Glikol Ve riner Sistem Taş Modeli	10
2.4. Oksidatif Stres Ve Serbest Radikaller	11
2.5. Osteopontin	17
2.6. Melatonin	17
2.6.1. Melatonin sentezi	18
2.6.2. Melatonin etki mekanizması	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Çalışma Grupları	20
3.2. Biyokimyasal İncelemeler	22
3.2.1. GSH düzeyi tayini	22
3.2.2. SOD aktivitesi tayini	22
3.2.3. MDA düzeylerinin lçm	22
3.2.4. Oksidatif DNA hasarı lçm	22
3.2.5. Miyeloperoksidaz Aktivitesi Tayini	23
3.2.6. Kaspaz-3 aktivite tayini	23
3.2.7. Western Blot yöntemiyle Kaspaz-3, iNOS ve MMP-9 protein ekspresyonları tayini	24
3.2.8. Osteopontin gen ekspresyon düzeylerinin SYBR Green ile qRT-PCR lçlmesi	24
3.2.9. N-asetil-β-glukozaminidaz enzim aktivitesi lçm	26

3.2.10. Histolojik incelemeler	26
3.2.11. İstatistiksel analiz	26
4. BULGULAR	27
4.1. İdrar Analiz Sonuçları	27
4.2 Böbrek Dokusunda Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular	29
4.2.1. Glutatyon (GSH) ve süperoksid dismutaz (SOD)	29
4.2.2. Malondialdehit (MDA) ve myeloperoksidaz (MPO)	29
4.2.3. Kaspaz-3 aktivitesi ve oksidan DNA hasarı (8-hidroksi guanosin)	29
4.2.4. iNOS protein ekspresyonu	34
4.2.5. Matriks metalloproteinaz-9 ekspresyonu	35
4.2.6. Osteopontin gen ekspresyonu sonuçları	36
4.2.7. Serumda ve dokuda N-asetil- β -glukozaminidaz enzim aktivitesi sonuçları	38
4.3. Histolojik Bulgular	40
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇLAR	50
7. KAYNAKLAR	51
8. EKLER	64
8.1. Ek 1. Etik Kurul Onayı	64
8.2. Özgeçmiş	65
8.2.1. Kişisel Bilgiler	65
8.2.2. Öğrenim bilgileri	65

8.2.3. Klinik rotasyonlar	66
8.2.4. Uluslararası makaleler	67
8.2.5. Ulusal makaleler	69
8.2.6. Uluslararası bildiriler	70
8.2.7. Ulusal bildiriler	73



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Üriner sistem taş hastalığı (ÜSTH) böbrek fonksiyon bozukluğuna ve kalıcı renal hasara yol açabilen önemli bir ürolojik hastalıktır. Üriner sistem taş hastalığının sık görülme ve tekrarlayıcı nitelikte olması özelliklerinden dolayı taş oluşumunu önleyici mekanizmalar üzerinde yapılan çalışmalar her geçen gün daha da önem kazanmaktadır. Üriner sistem taş hastalığı erişkin yaş gruplarında Avrupa'da %5-9 arasında, Kanada'da %12, Amerikada %13-15 oranlarında saptanmaktadır.¹ Adolesan yaş grubunda insidans çalışmaları taş hastalığı sıklığının hızla arttığını göstermektedir.²⁻⁶ Amerika Birleşik Devletleri'nde ÜSTH prevalansının genel popülasyonda %10-15 arasında değiştiği bildirilmiştir.⁷⁻⁹ NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) verileri incelendiğinde 1976-1980 yılları arasında %3.8 olan ÜSTH prevalansının 1988-1994 yılları arasında %5.2'ye çıktığını, yani %37 oranda arttığı bildirilmiştir.¹⁰ ÜSTH, erkek popülasyonda kadınlara oranla hastalığın 2-3 kat daha sık görüldüğü bildirilmiştir.¹¹

ÜSTH'nin kronik böbrek yetmezliğine (KBY) sebep olması, bu hastalık üzerine yapılan çalışmaları arttırmıştır. ÜSTH, erişkin popülasyonda görülen KBY'nin %3.2'sinden, pediatrik popülasyonda görülen KBY'nin %3.8'inden sorumludur.¹²⁻¹⁶ Türkiye'de yapılan kohort çalışmaları, pediatrik yaş grubunda görülen KBY'nin %8'inden ÜSTH'nin sorumlu olduğunu ortaya koymuştur.¹⁷ ÜSTH, tüm yaş gruplarında hayat boyunca taş hastalığı %50 oranda tekrarlamaktadır.^{1,18}

ÜSTH olan hastalar için harcanan senelik ödenekler incelendiğinde 2000 yılında yaklaşık 2.1 trilyon dolar harcama yapıldığı ve bu miktarın 1994 yılında yapılan harcamaya oranla %50 oranda artmış olduğu görülmüştür.¹¹ Bu yüksek miktardaki ödemeler de ÜSTH'nı önleyici tedavi protokollerinin geliştirilmesinin önemini göstermektedir.

Üriner sistem taşlarının oluşumu, çok basamaklı biyokimyasal olaylardan meydana gelmektedir. Temel olarak çekirdek oluşumu (nükleasyon), kristal büyümesi,

kristal birikimi ve sonuçta oluşan kristallerin tübüler sistemden atılamaması ve tutulması ile oluşmaktadır.^{19, 20} İdrarda artan oksalat ve kalsiyumun oluşturduğu CaOx, çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle CaOx süpersatürasyonuna neden olmakta ve takiben gelişen oksidatif hasar ile hücre hasarına ve nükleasyona sebep olarak kristal oluşumu başlatmaktadır. Kristal büyümesi, birikmesi ve hücre membran hasarı sonrası ortaya çıkan kristal bağlayıcı moleküllerle birleşmesi sonucu kristal adhezyonu ve tutulumu ile üriner sistem taşı oluşmakta ve renal epitelyum hasarına yol açmaktadır.^{19, 21, 22}

Literatürde yaygın olarak kullanılan deneysel model %0.75 etilen glikol (EG) ile indüklenen ÜSTH modelidir. Hücre kültürlerinde ve in-vivo deneysel çalışmalarda reaktif oksijen türevlerindeki (ROT) artışın taş oluşumunda önemli rol oynadığı belirlenmiştir.²³ Literatürde bulunan antioksidan tedavinin taş oluşumunda ve/veya taşa bağlı renal hasardaki rolü ile ilgili görüşler doğrultusunda çalışmamızda EG modelinde melatoninin böbrekte taş oluşumuna bağlı hasar üzerindeki etkileri çeşitli parametreler eşliğinde incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Taş Oluşum Mekanizmaları

Taş oluşumu ile ilgili çalışmalar ilk olarak 1937 yılında Randall'ın renal papillanın ucunda ve çevresinde biriken kristal birikimini göstermesi ve bu kristalleri kalsiyum fosfat kristalleri olarak tanımlamasıyla başlamıştır.²⁴ Bu tarihten sonra taş oluşum mekanizmaları ile ilgili çalışmalar hız kazanmış ve detaylandırılmıştır. Taş oluşumu glomerular filtratın nefrondan geçişi esnasında gelişen kompleks mekanizmalar sonucu gerçekleşir. Taş oluşumuna sebep olan tuzların süpersaturasyonunu takiben presipitasyon, kristalizasyon ve nükleasyon gerçekleşir. Kristal oluştuktan sonra ya idrarla atılır ya da retansiyona uğrayarak kristal birikimi ve sonucunda taş oluşumuna sebep olur.

İdrarda taş oluşturan tuzlardan en önemlileri kalsiyum ve oksalattır. Taş oluşum mekanizmaları araştırılmasında tarihsel süreç içerisinde 1968'de Nordin ve ark.'ın ve 1980'de Robertson ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda oksalatın kalsiyuma oranla taş oluşumunda daha önemli bir yere sahip olduğu düşünülmüştür.²⁵⁻²⁸ Ancak 2004'de Pak ve ark.'nın yaptığı çalışmalar idrar kalsiyumunun ve idrar oksalatının taş oluşumunda eşit önemde olduğu ve katkı yaptığı saptanmıştır.²⁹⁻³¹

İdrarda kalsiyum oksalat (CaOx) konsantrasyonu normal doygun bir sulu çözeltide bulunduğundan 4 kat fazladır. Taş oluşumu inhibitörlerinin varlığında CaOx presipitasyonu ancak çözünürlüğünün 7 ila 11 katı kadar yüksek olduğunda gerçekleşir. Saf bir solüsyonda gerçekleşen nükleasyon, homojen nükleasyon olarak adlandırılır. Homojen nükleasyon sonucu oluşan çekirdekler kristal oluşumun ilk basamağıdır ve stabil değildir. Bu çekirdekler belirli bir büyüklüğün altında ise veya idrarın nefrondan geçiş zamanı kısa ise çözülebilir veya idrarla atılabilir ve taş oluşumuna sebep olmazlar. Taş oluşumu inhibitörleri bu çekirdeklerin büyümesini engellerken taş oluşumunu hızlandıran teşvik mekanizmaları ise bu çekirdeklerin üzerinde bağlantı noktaları oluşturarak büyümelerine ve kristal oluşumuna sebep olur. İdrarda kristal oluşumu

genellikle mevcut epitel hücrelerinin, hücre çöküntülerinin veya diğer kristallerin üzerinde çekirdeklerin bağlanması ve kristalizasyonu yani heterojen nükleasyon sonucu gerçekleşir.³²⁻³⁴ Yapılan çalışmalar idrarın normal geçiş süresi içerisinde böbreğin herhangi bir noktasında retansiyona uğrayabilecek büyüklükte kristal oluşumunun mümkün olduğunu göstermiştir.³⁵ Kok ve Khan, 1994 yılında CaOx taşı oluşumunda 2 teori bildirmiştir. Bunlardan biri sabit partikül teorisidir. Bu teoriye göre kristallerin bağlandığı ve yüksek yoğunluktaki idrara daha uzun süre maruz kaldığı bağlantı noktaları mevcuttur.³⁵ Khan ve ark.'nın yaptıkları çalışmada bu bağlantı noktalarının oksalata bağlı renal tübüler hücre hasarı sonucu ortaya çıktığını göstermiştir.³⁶ Yine Khan ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda da yüksek oranda oksalat verilen hayvanlarda oluşturulan CaOx taş modellerinde tübüler hücre hasarı göstergesi olan N-asetil-β-glukozaminidazın ve alkalen fostatın idrarda belirgin olarak arttığı izlenmiştir.³⁷ Verkoelen ve ark. da CaOx kristallerinin hasarlı renal epitele bağlandığını, yaptıkları in-vitro çalışmada göstermiştir.³⁸ Yapılan klinik çalışmalarda CaOx kristallerinin renal tübüler hücrelerden endositozu ve sonrasında bu kristallerin bazal membranda, interstisyumda birikmesi ve sonucunda gerçekleşen hücre hasarına ve ölümüne sebep olduğu oksalat metabolizma bozukluğu olan hastalarda gösterilmiştir.³⁹ Knoll ve ark. 2004'de yaptıkları hücre kültürü çalışmasında interstisyumun kristal birikimi ve taş oluşumunda primer bölge olduğunu ortaya koymuştur.⁴⁰

Magnezyum, sitrat ve pirofosfat, kristal birikimi önleyerek taş oluşumuna engel olan en önemli inhibitörlerdendir. Sitrat, CaOx ve kalsiyum fosfat taşlarının oluşumunu birkaç mekanizma ile inhibe etmektedir. Bunlardan ilki, sitratın kalsiyum ile bağlanıp kompleks oluşturarak oksalat ve fostat ile birleşip taş oluşumuna sebep olacak iyonize kalsiyum miktarını azaltmasıdır. İkincisi, sitratın direk olarak CaOx birikimini ve çökmesini engellemesidir. Son olarak, sitrat, monosodyum ürat üzerinden gelişen heterojen nükleasyonu engellemektedir.⁴¹⁻⁴⁴ Magnezyum, oksalat ile birleşerek iyonik oksalat miktarını azaltır ve CaOx süpersatürasyonunu azaltır ve böylece CaOx taşlarının oluşumunu inhibe eder.⁴⁴ Nefrokalsin, böbrekte üretilen bir glikoproteindir ve CaOx nükleasyonunu ve birikimi engeller.⁴⁵⁻⁴⁷ Tamm-Horsfall mukoproteini, idrarda en

yüksek oranda bulunan proteindir ve kristal birikimini engeller.^{48, 49} Ayrıca üropontin ve bikuninin de kristal büyümesini ve birikimini engellediği gösterilmiştir.⁵⁰

Üriner sistem taşlarının en önemli komponenti kalsiyumdur ve tüm taşların yaklaşık %75'inde mevcuttur. CaOx taşları tüm üriner sistem taşlarının %60'ını oluştururken CaOx hidroksiapatit taşları %20, ürik asit ve strüvit (magnezyum amonyum fosfat) taşları yaklaşık %10'ar, bruşit taşları %2 oranda görülmektedir.^{51, 52} Kalsiyum taşlarının oluşumunda hiperkalsiüri, hipositatüri, hiperürükozüri ve hiperoksalürinin sorumlu olduğu gösterilmiştir.^{43, 53} Ürik asit taşları asidik idrarda oluşur.^{54, 55} Sistin taşlarında sistinin renal absorpsiyonundaki bozukluklarda karşımıza çıkmaktadır ve nadir görülür.⁵⁶ Strüvit taşları ise üreaz üreten bakterilerin sebep olduğu alkali idrarda oluşur.⁵⁷

Kalsiyum taşlarının patogenezindeki en önemli faktör hiperkalsiüridir. İdrarda artan kalsiyum, kalsiyum tuzlarının saturasyonunu artırır ve sitrat ve kondroitin sülfat gibi taş oluşum inhibitörleriyle kompleks oluşturup inhibitör özelliğini azaltır ve taş oluşumuna sebep olur. İdrarda kalsiyum miktarını azaltmaya yönelik tedavi stratejilerinin taş rekürrensini azaltması ve ayrıca hiperkalsiürisi devam eden olgularda medikal tedaviye cevap alınamaması hiperkalsiürinin önemini göstermektedir.^{58, 59} Bunun dışında, kalsiyum taşlarının prekürsörü olarak gösterilen Randall plaklarının hiperkalsiüri ile direkt olarak bağlantılı olduğu gösterilmiştir.⁶⁰⁻⁶²

2.1.1. Hiperkalsiüri

Kalsiyum metabolizmasında barsaklar, kemikler ve böbrekler görev almaktadır. 1974 yılında Pak ve ark. hiperkalsiüriyi 3 alt başlıkla tanımlamışlardır; absorptif hiperkalsiüri, renal hiperkalsiüri ve rezorptif hiperkalsiüri.⁶³

2.1.1.1 Absorptif hiperkalsiüri

Absorptif hiperkalsiüride altta yatan patofizyoloji artmış intestinal kalsiyum emilimidir ve taş hastalıklarının %55'inden bu patoloji sorumludur. Barsaklardan emilen yüksek miktardaki kalsiyum, serum kalsiyumunda artışa neden olarak parathormon (PTH)

baskılanmasına ve takiben böbreklerden kalsiyum atılımının artmasına sonuç olarak hiperkalsiüri gelişmesine sebep olur.

2.1.1.2. Renal hiperkalsiüri

Böbreklerden günde yaklaşık 270 mmol kalsiyum filtrasyonu gerçekleşir ve bu filtrasyona uğrayan kalsiyumun %98'inin geri emilmesi ile kalsiyum homeostazı sağlanır. Bu emilimin %70' i proksimal tübülde gerçekleşir. Böbrek hasarı, anatomik ve fonksiyonel defektler nedeniyle tübüler emilimin bozulması idrarda kalsiyum miktarının artmasına ve sekonder hiperparatiroidiye sebep olur. Serum kalsiyum seviyeleri normal sınırlardayken kalsiyum alımı olmaksızın hiperkalsiüri görülür.

2.1.1.3. Rezorptif hiperkalsiüri

Genellikle primer hiperparatiroidide görülen nadir bir durumdur. Paratiroid adenomuna bağlı artan PTH sekresyonu ile kemikten kalsiyum mobilizasyonu ve artmış 1.25 (OH)₂D₃ sentezine bağlı barsaklardan artmış kalsiyum emilimi görülür. Sonuç olarak artmış serum ve idrar kalsiyumu ve azalmış serum fosfat seviyeleri izlenir.

2.1.1.4. Hiperkalsiürinin diğer nedenleri

Sarkoidoz ve granulomatöz hastalıklarda, malignitelere bağlı hiperkalsemi ve glukokortikoid ile indüklenen hiperkalsemi de hiperkalsiüri ve taş hastalığı görülebilir.

2.1.2. Hiperoksalüri

İdrarda artan oksalat, CaOx kristal oluşumuna ve birikimine sebep olurken lipid peroksidasyonu ve ROT oluşumu aracılığıyla renal tübüler hücre hasarına yol açmaktadır.

2.1.2.1 Primer hiperoksalüri

Primer hiperoksalüri nadir görülen otozomal resesif bir metabolizma bozukluğudur. Glioksalatın glisine dönüşümündeki bozulma ve glioksalatın oksalata dönüşmesi ile karakterizedir. İdrarda artan oksalat, hem renal tübüler hücrelerin yüzeyine bağlanarak kristal bağlanması ve büyümesi için tetikleyici odaklar oluşturur hem de renal tübüler hücreler tarafından endositoza uğrayıp renal interstisyuma salgılanır ve böylece taş oluşumunu başlatır.⁶⁴

2.1.2.2. Enterik hiperoksalüri

Barsaklarda kalsiyum ile oksalatın kompleks oluşturmasını engelleyen mekanizmalar serbest oksalatın artmasına ve emilmesine sebep olur. Malabsorpsiyona neden olan herhangi bir patoloji oksalatın barsaktan emiliminde artışa yol açabilir. İnce barsak rezeksiyonları, intrensek barsak hastalıkları, jejunoileal bypass cerrahileri hiperoksalüri ile ilişkilidir.

2.1.3. Hiperürikozüri

Kalsiyum taşı olan hastaların %10'unda idrarda ürik asit yüksek bulunmuştur.⁶⁵ Hiperürikozüri, idrarda monosodyum urat seviyesini arttırarak CaOx taş oluşumuna sebep olur. İdrar pH'sının 5.5'in altında olduğu durumlarda ürik asit ve/veya CaOx taşları oluşurken, idrar pH'sı 5.5'ten yüksek olduğunda heterojen nükleasyon ile sodyum urat aracılı CaOx taşları oluşur. Ayrıca, ürik asit kristalleri üriker glikozaminoglikanları bağlayarak bu moleküllerin taş oluşumunu inhibe edici etkilerini ortadan kaldırırlar.

2.1.4. Hipositratüri

Hipositratüri, kalsiyum taşı olan hastaların %10'unda saptanmaktadır ve düzeltilebilen bir etiyolojik faktördür. İdrarda sitrat atılımı düzenleyen en önemli faktör asit-baz dengesidir. Metabolik asidoz, sitratın renal tübüler reabsorpsiyonunda artışa ve peritübüler hücrelerde sitrat sentezinde azalmaya sebep olur.⁶⁶

2.1.5. Düşük idrar pH'sı

İdrar pH'sı 5.5'in altında olduğunda ürik asit serbest halde bulunur ve heterojen nükleasyon ile CaOx taşlarının oluşumuna sebep olur.⁵⁵

2.1.6. Renal tübüler asidoz

Renal tübüler asidoz (RTA), tübüler hidrojen iyon sekresyonunda ve bikarbonat reabsorpsiyonundaki bozukluklarla karakterize bir sendromdur. Tip 1 (distal) RTA, en sık görülen RTA formudur. Tip 1 RTA hastalarının %70'inde üriner sistem taş hastalığı mevcuttur.⁶⁷ Hastalığın bu formunda sistemik asidoza rağmen idrarın asidifiye edilmesinde bozukluk vardır. Klasik bulgular hipokalemi, hiperkolesterolemi, metabolik asidoz, yüksek idrar pH'sı (pH>6) ve üriner sistem taşlarıdır. En sık görülen taşlar hiperkalsüri, hipositratüri ve artmış idrar pH'sına bağlı olarak oluşan kalsiyum fosfat taşlarıdır.

2.1.7. Hipomagnezürü

Hipomagnezürü, taş hastalarının %1'inde görülen nadir bir etiyolojik faktördür. Magnezyum oksalat ve kalsiyum ile kompleks oluşturarak taş oluşumunu engeller. İdrarda magnezyumun azalması, taş oluşum inhibitör özelliğinin azalmasına ve ayrıca idrarda sitrat seviyelerinin azalmasıyla birlikte taş oluşumun artmasına sebep olur.

2.2. Taş Oluşumunda Hücresel Değişiklikler

Son 10 yılda araştırmalar, yüksek oksalat ve kristal konsantrasyonunun renal tübüler hücrelerdeki etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. İn vitro modellerde oksalatın inflamasyonu, oksidatif, kemotaktik ve fibrojenik olayları uyardığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan yüksek oksalat ile idiyopatik CaOx taşlarından ziyade primer hiperoksalürinin ilişkisi incelenmiştir. Ancak bu invitro çalışmalar tübüler hücrelerdeki farklılaşmayı gösterememiştir. 2002 yılında Katsuma ve ark. CaOx kristallerinin multipotent böbrek mezenkim hücrelerin embriyonik göstergesi olan vimentin gen transkripsiyonunda upregülasyona neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. CaOx kristalleri veya yüksek oksalat konsantrasyonu Henle kulbu boyunca inflamasyonu tetiklemektedir ve Henle kulbunda osteotid hücreler aracılığıyla osteojenik hücrelerin farklılaşma

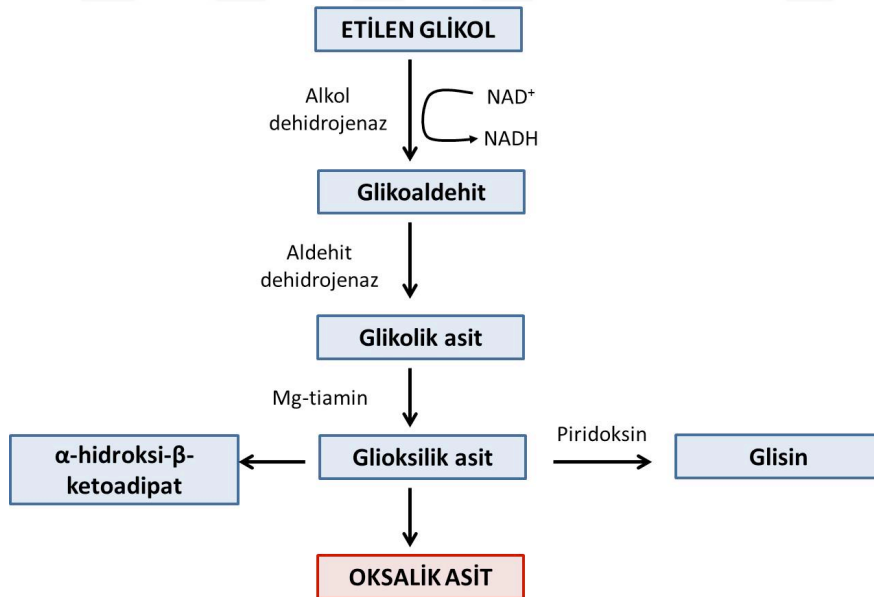
sürecine benzer şekilde değişim gerçekleşmektedir.^{68, 69} Osteopontin (OPN), osteokalsin gibi osteoid proteinler Henle kulbunun bazal membranında hidroksiapatit mineralizasyonuna yol açarlar. Çalışmalar papiller interstisyum ve bazal membrandaki kristal oluşumlarında ve Randall plaklarında kemik-benzeri hidroksiapatit kristallerini içerdiğini göstermektedir. Bu bulgular Henle kulbunda aktif bir biyomineralizasyonun ve farklılaşmanın olduğunu desteklemektedir.⁶²

Literatürde taş olumum mekanizmaları incelendiğinde inflamatuvar süreçlerin çok önemli bir yer tuttuğu görülmektedir. Nitekim Khan, 2013 yılında yazdığı derlemede CaOx taşlarının oluşumunda oksijen türevlerinin ve inflamasyonun ilişkisini açıkça belirtmiştir. Taş oluşumunun patolojik biomineralizasyona ve ektopik kalsifikasyona bağlı olduğunu, bu süreçlerin de ROT'un ve buna bağlı olarak oksidatif stresin artışına dikkat çekmiştir.⁷⁰ Benzer şekilde Taguchi ve ark. sıçanlarda EG ile oluşturduğu üriner sistem taş modelinde inflamatuvar süreçlerin rolünü göstererek taş oluşumu ve taşa bağlı hasar üzerinde pioglitazonun antioksidan ve anti-inflamatuvar rolünü ve renal tübüler hücrelerdeki koruyucu etkilerini bildirmişlerdir.⁷¹

Üriner sistem taş hastalığının oluşumuna sebep olacak patolojilerin daha iyi anlaşılması, taş oluşum mekanizmalarının ortaya konması ve sonuç olarak kristal oluşumunu, birikimi ve çökmesini engelleyici tedavilerin bulunması amacıyla öncelikle hayvan çalışmalarında taş oluşum modelleri çalışılmıştır. Bu hayvan çalışmalarında CaOx taş hastalığı oluşturmak için ciddi bir hiperoksalüri gerekmektedir. Sıçanlarda hiperoksalüri çeşitli diyetlerle geliştirilebilir; etilen glikol, oksalat ve gentamisin sülfat gibi kristal oluşumunu indükleyen ajanlar bu modellerde kullanılmıştır. Bunun yanısıra pek çok taş hastasında sıklıkla çeşitli tip tübüler fonksiyon bozukluğu olduğu için bazı modellerde iki durum birlikte yaratılmıştır. Hem idrarda hiperoksalüri veya hiperkalsiüri tetiklenerek, yani idrar biyokimyası değiştirilerek, hem de renal hücresel fonksiyon bozukluğu yaratılarak kristal retansiyonu ve büyümesine uygun ortam sağlanarak taş oluşumu sağlanmıştır.⁷² Çalışmamızda üriner sistem taş hastalığı modeli oluşturmak için kullanılan ajan etilen glikoldür.

2.3. Etilen Glikol Ve Üriner Sistem Taş Modeli

Etilen glikol hafif tatlı bir dihidrik alkoldür. Kokusuz, renksiz, suda çözünen ve antifriz özelliğinde olan bir sıvıdır. Etilen glikolün yutulması nadirdir, yanlışlıkla alımı ciddi toksisiteye yol açar. Gastrointestinal kanaldan hızla absorbe edilir, 1-4 saatte maksimum kan konsantrasyonuna ulaşır. Yarılma ömrü 3-8 saattir. Deri ve akciğerden absorpsiyonu düşüktür. Letal doz %100'lük EG için 1,4 ml/kg'dır. Alkole benzer şekilde sarhoşluk verir. Kendisi toksik değildir ancak karaciğerde metabolizma sonrası toksik ürünlere döner. Etilen glikol, alkol dehidrojenaz ile glikoaldehit, glikolik asit, gliksilik asit ve oksalik asit olmak üzere 4 organik asite dönüşür (Şekil 1). Bu metabolitler hücreler için toksiktir ve oksidatif metabolizmayı bozarak santral sinir sisteminde depresyon ve kardiyopulmoner ve renal yetmezliğe yol açar.⁷² Etilen glikolün metabolizmasında hız kısıtlayıcı basamak glikolik asitin gliksilik asite dönüşümüdür. Gliksilik asit kanda birikir, ciddi asidoza ve oksalatın böbrekte kalsiyum oksalat halinde çökmesine neden olur.



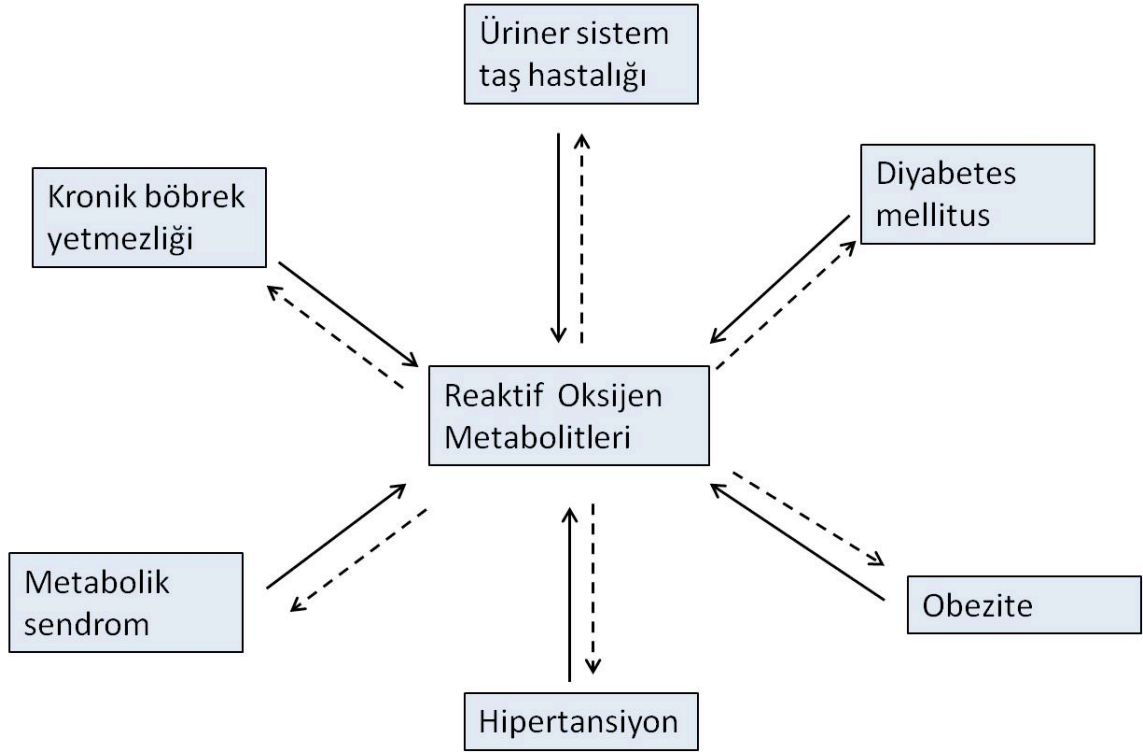
Şekil 1. Etilen glikolün metabolizması ve oluşan ürünler.⁷²

Oksalat, böbreklerden atılan çözünürlüğü düşük bir metabolik atık ürünüdür. Oksalat metabolizma bozuklukları herediter hiperoksalüride, bazı zehirlenmelerde (etilen glikol, vitamin C gibi) ya da enterik hiperoksalüride (malabsorbsiyon, gastrik bypass veya Oxalobakter'in barsaktaki yetersiz kolonizasyonunda) görülebilir. Hiperoksalürinin üriner sistem taş hastalığından böbrek yetmezliğine ve yaşamı tehdit eden organlarda oksalat birikimi ile karakterize sistemik oksalozise kadar uzanan ciddi sonuçları vardır. Hiperoksalüride tedavi oksalat alımının azaltılması ve kalsiyum alımının artırılmasıdır. İdrarın dilüe edilmesi ve böbrekte taş oluşum inhibitörlerinin uygulanması gereklidir. Vitamin B6 ve probiyotik eklenmesinin de faydalı olduğu gösterilmiştir.⁷³

2.4. Oksidatif Stres Ve Serbest Radikaller

Oksidatif stres günümüzde diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve obezite gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (Şekil 2).⁷⁴ Benzer şekilde oksidatif stresin böbrekte taş oluşumunda ve böbrek hasarında ilişkisi olduğu bildirilmiştir.^{23, 70} Oksidatif hasar çok çeşitli nedenlerle organizmada artan serbest radikallerin neden olduğu hasarı tanımlamaktadır.

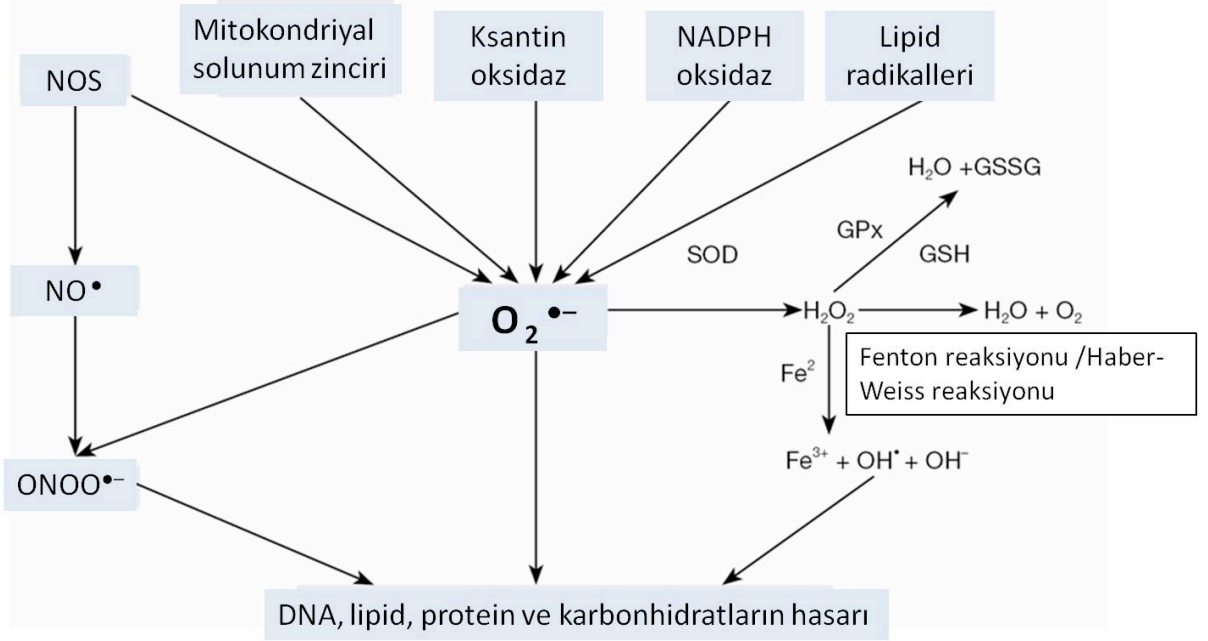
Holoch ve Tracy, antioksidanların in-vitro renal tübüler epitel hücrelerde CaOx mono-kristallerinin toksik etkilerini nötralize edebileceğini ileri sürmüşlerdir. Holoch NHANES III'e (National Health and Nutrition Examination Survey) katılan 17,695 yetişkinin serumlarında antioksidan düzeyi ölçerek üriner sistem taş hastalığı olan ve olmayanları karşılaştırmıştır. Likopen, Vitamin A, Vitamin E, alfa karoten, beta kriptoksantin (provitamin A), lutein/zeaxantin (karotenoidler) ve retinil esterlerin serum düzeyleri ölçülmüş ve bu antioksidanların düzeyleri, taş hastalığı olanlarda anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ölçülen antioksidanlar içinde alfa-karoten, beta-karoten, ve beta-kriptoksantin üriner sistem taş hastalığında koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra taş hastalarında obezite ve diyabet gibi oksidatif stres ilişkili hastalıkların varlığı da taş hastalığı ve oksidatif stres ilişkisini doğrulamıştır.⁷⁵



Şekil 2. Reaktif oksijen türevlerinin taş hastalığı ve diğer oksidatif stres-kaynaklı hastalıklarla ilişkisi.⁷⁴

Serbest radikaller, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir ve ROT olarak bilinirler. Normal şartlarda oluşumları kontrol altındadır. Çeşitli düzenleyici biyomoleküllerin proliferasyonu, aktivasyonu, inaktivasyonu gibi rollere sahiptirler ve sinyal iletilerinde rol alırlar.

Major ROT, superoksit anyon ($O_2^{\bullet-}$), nitrik oksit radikali (NO^{\bullet}), hidroksil radikali (OH^{\bullet}) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) olarak bilinmektedir ve çok çeşitli yollarla oluşurlar. $O_2^{\bullet-}$, NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, lipoksijenaz, siklooksijenaz ve hem oksijenaz aracılı oluşur ve solunum zincirinin yan ürünlerinden biridir. Lipid radikalleri de $O_2^{\bullet-}$ oluşturur. NO^{\bullet} , L-arjininin endotelial-NOS tarafından oksidasyonu ile oluşur, ancak endotelial-NOS, $O_2^{\bullet-}$ da oluşturur ve $O_2^{\bullet-}$ ile NO birleştiğinde oldukça reaktif olan peroksinitrite $ONOO^-$ dönüşüm gerçekleşir (Şekil 3).^{23, 76}



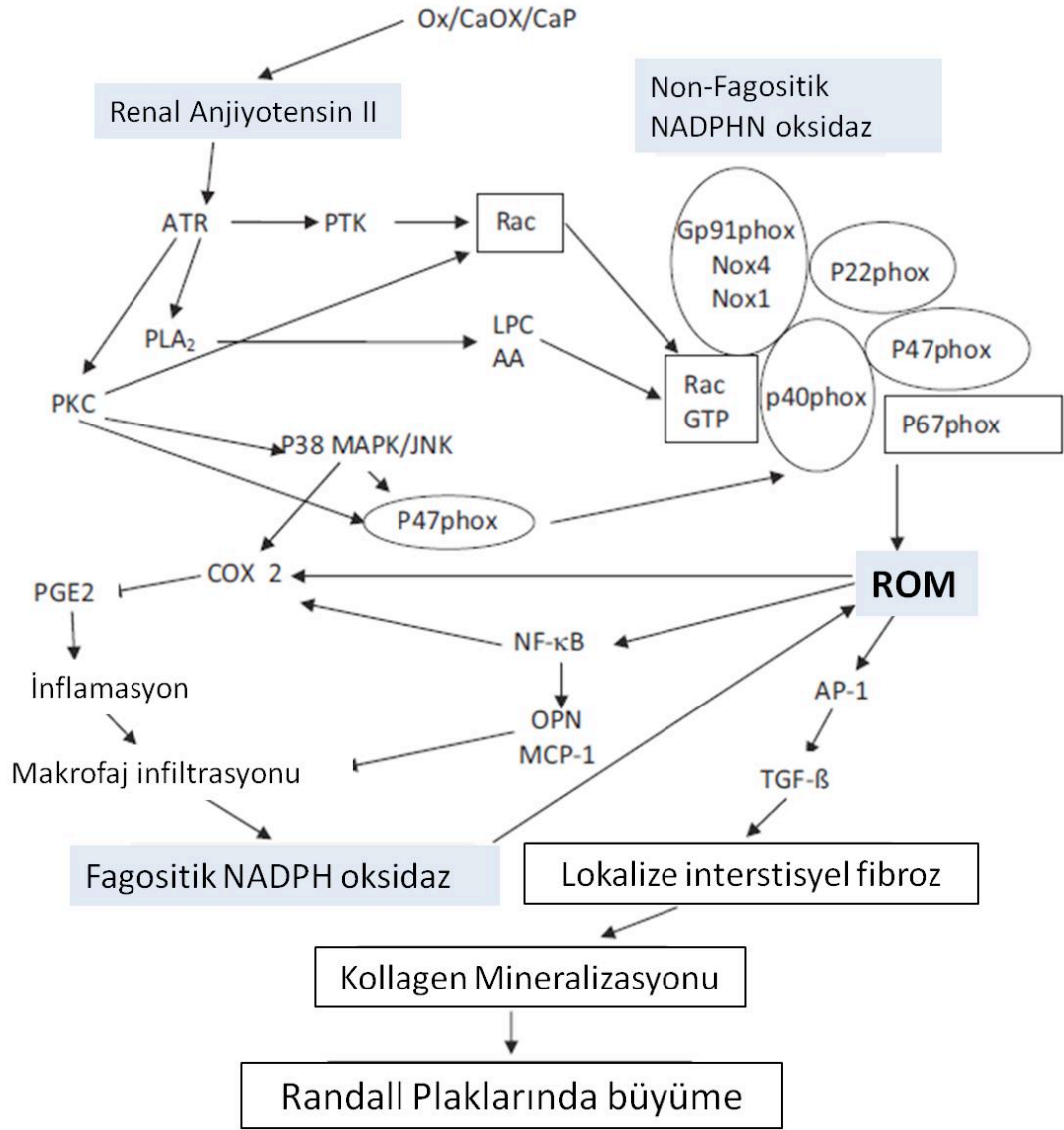
Şekil 3. Moleküler oksijenden türeyen reaktif oksijen türevleri.^{23, 76}

ROT, protein tirozin kinazlar ve fosfatazlar, serin/teorin kinazlar ve fosfatazlar, çeşitli fosfolipazlar gibi sinyal moleküllerini ve pek çok kalsiyum aracılı sinyalleri de düzenlemektedir. Ancak ROT aracılı sinyal yolları bunlarla sınırlı değildir. ROT, aynı zamanda c-fos, c-myc ve c-jun ve transkripsiyon faktörü AP-1 ve NF-kB gibi genleri de düzenler. Buna ek olarak, ROT apoptozun başlamasına ve sürdürülmesine de aracılık eder.

ROT, bu şekilde sinyal yollarındaki etkilerini normal şartlarda üretildiğinde oluşturur ve sonra çeşitli antioksidanlar tarafından temizlenirler. Kısa ömürlüdürler ve gerekli olan dokularda oluşup etkilerini gösterirler ve bu durum sıkı kontrol altındadır. ROT ayrıca proteinlerde, lipidlerde ve nükleik asitlerde kimyasal modifikasyonlara ve bu moleküllerde hasarlara yol açabilirler; redoks-bağımlı sinyalleme yolu aracılığı ile renal ve kardiyovasküler sistemde değişikliklere yol açarlar. ROT üretimi kontrolden çıkarsa veya endojen antioksidan kapasite zayıflarsa oksidatif strese (OS) neden olur. OS ise inflamasyon ve hasara yol açar. Pek çok doku hücre içinde önemli bir antioksidan olan glutatyon ile OS'ye karşı koyar.

ROT üretiminde mitokondri ve NADPH oksidazın rolü bilinmektedir (Şekil 4). Nitekim antioksidanlar ve benzer şekilde NADPH oksidaz inhibitörleri kristallere bağlı hasar oluşumunu engellemiştir. Benzer şekilde antioksidanlar ve SR süpürücüler hücresel hasarı düzeltebilmektedir.⁷⁶⁻⁷⁸ NADPH oksidaz inhibitörlerinin, katalazın ve süperoksit dismutazın çeşitli hücre kültürlerinde kristal maruziyetini takiben artan hidrogen peroksit ve 8-izoprostan oluşumunu ve LDH salınımını baskıladığı gösterilmiştir.⁷⁹





Şekil 4. Taş oluşumunda NADPH oksidazın ROS ilişkisi. Renal hücrelerin yüksek miktarda oksalat, CaOx/CaP kristallerine maruziyet ve kristal depolanması ile birlikte artan mekanik stres renin up-regülasyonuna ve böylece anjiyotensin II oluşumuna neden olur. Non-fagositik NADPH oksidaz aktive olunca ROS üretilir ve bu olaya protein kinaz C aracılık eder. Bu aktivasyon p47^{phox}'un fosforilasyonu ile Rac1 ve p47^{phox}'un membrana translokasyonu aracılıdır. Ayrıca NF-κB, ve TGF-β gibi çeşitli

transkripsiyonel ve büyüme faktörleri de olaya aracılık eder. Sonrasında monosit kemoatraktan protein 1 (MCP-1) gibi kemoatraktanlar ve OPN gibi kristalizasyon modülatörleri artar. Makrofajlar renal interstisyuma kristal depozitlerinin etrafına infiltre olur. Fagositik NADPH oksidaz'ın aktivasyonu daha fazla ROT üretilmesine yol açar. İnflamasyon, fibrozis, kollagen depolanması, mineralizasyon gibi zincirleme ilerleyen bu olaylar, interstisyel CaP depozitlerinde artışa ve Randall plaklarının büyümesine neden olur.

Taş hastalarının idrarlarında yüksek bulunan glutamil transpeptidaz, anjiyotensin-1 dönüştürücü enzim (ACE), galaktosidaz ve N-asetil- β -glukozaminidaz (NAG) tübüler hasarın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Renal enzimler yanı sıra idrarda yüksek bulunan tiobarbitürik aside duyarlı maddeler (TBARS) de taş hastalarında ROT üretiminin arttığını ve renal oksidatif hasara neden olduğunu vurgulamaktadır. DNA hasarının göstergesi olan 8-hidroksideoksiguanozin (8-hidroksiguanosin) düzeyleri de NAG düzeylerine benzer şekilde taş hastalarında hasarla orantılı olarak idrarda yüksek bulunmuştur. Araştırmalar taşın oluşumunun özellikle oksidatif hasara uğrayan hücrelerde başladığını vurgulamaktadır. Bu görüşe katılan pek çok çalışmada da antioksidan düzeyleri düşük olan hastalarda taş oluşumuna yatkınlık dikkat çekmiştir.²³

İn-vitro hücre kültürü çalışmalarında renal epitel hücrelerin CaOx monohidrat kristallerine maruziyeti hücrede spesifik genlerin transkripsiyon aktivatörlerinin, ekstraselüler matriks regülatörlerinin, büyüme faktörlerinin ekspresyonunda ve OPN, PG-E2, bikunin, heparan sulfat, osteonektin, fibronektin gibi pro- ve anti-inflamatuar moleküllerin oluşumunda artışa neden olmuştur. Bu moleküllerin pek çoğu, inflamasyon ve fibrozis oluşumunda yer almalarının yanı sıra biyomineralizasyonda da rol oynarlar.^{78, 80}

2.5. Osteopontin

Osteopontin asidik bir glikoproteindir. Arjinin-glisin-aspartik asit dizilimine sahiptir. Osteopontin, makrofaj kemoatraktanı gibi davranır. Osteoklastlar, bazı epitelyal hücreler, makrofajlar, T hücreleri, düz kas hücreleri ve bazı tümör hücreleri gibi çok çeşitli hücreler OPN'i yapısal veya indüklenebilir formlarda eksprese eder. OPN subkutan olarak sıçanlara uygulandığında makrofajlara bağlanarak monosit infiltrasyonunu indüklemiştir. Buna karşılık kemoatraktanların uyardığı makrofaj birikimi ise anti-OPN antikorları ile nötralize edilmiştir.⁸¹

Osteopontin güçlü bir kemotaktik proteindir ve monosit/makrofajlar için adhezif özellik gösterir. Tübülointerstisyel ve glomerüler hasarda patolojik role sahiptir. İlginç olarak tübülointerstisyel hasar orta derecede ise OPN ekspresyonu da orta derecededir. Kronik hasar modellerinde az çalışma vardır ve sürekli OPN ekspresyonu kronik makrofaj akümülyasyonuna ve kronik hasara yol açar.⁸²

OPN'in makrofaj akümülyasyonunu uyarıcı etkisi onun adhesif ve kemoatraktan özellikleri ile ilişkilidir. OPN, α -, β 3-integrinlere ve infiltre lökositlerde eksprese edilen ve hastalık sırasında böbrek hücreleri tarafından up-regüle edilen CD44 gibi pek çok liganda bağlanır. Nitekim anti-OPN antikor uygulaması renal OPN'de ve OPN ligandı olan CD44 ekspresyonunda inhibisyon yapmış; bu sonuçlar da OPN-CD44 etkileşiminin hem glomerüler hem de tübülointerstisyel hasarda lökosit adhezyonunu uyardığını düşündürmüştür.⁸¹

2.6. Melatonin

Melatonin, başlıca pineal bezden ve bunun yanında over, lens, kemik iliği hücreleri ile safra kanalı ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur.⁸³

Melatonin, organizmada cinsel gelişimin kontrolü, immün yanıtın oluşturulması, yaşlanma, uyku ve ısı düzenlenmesi gibi pek çok fizyolojik olayda rol oynamaktadır. Bu fonksiyonlarının yanı sıra, son yıllarda melatoninin güçlü bir antioksidan olduğu ve serbest radikaller aracılığı ile meydana gelen oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir.⁸⁴

Melatoninin lipofilik yapıda olması, hücrenin bütün organellerine girebilmesine, hücre çekirdeğine ulaşmasına ve kan-beyin bariyerini geçmesine olanak tanımaktadır. Melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi, DNA'yı oksidatif hasardan koruması açısından önemlidir.⁸⁵

2.6.1. Melatonin sentezi

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), pinealositler içine alınan triptofandan sentezlenir. Triptofan N-asetiltransferaz (NAT) enzimi ile önce serotonine dönüştürülür ve ardından diğer bir pineal enzim olan hidroksiindol-o-metiltransferaz aracılığıyla melatonine dönüşür. Bu sentez yolağının düzenlenmesi primer olarak gece saatlerinde gerçekleşmektedir, yani diğer bir deyişle karanlığa bağlıdır.

İnsanda birçok biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal değişkende olduğu gibi plazmadaki melatonin düzeyleri de 24 saatlik periyod içinde düzenli iniş çıkışlar gösterir. Gece saat 20.00-23.00 arası yükselen melatonin düzeyi saat 01.00-05.00 arası doruk değerlere ulaşır ve gündüz düşer.

2.6.2. Melatonin etki mekanizması

Melatonin, suya göre lipid çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle hücrelere rahatça girebilmektedir. Bu nedenle etkileri sadece membrana yönelik değildir. Sulu ortamda kısmen çözünmesi de intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkıda bulunur.

Melatoninin antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisi, reseptör aracılı olmayan ve moleküler yapısı ile ilişkili etkilerdir. Melatonin hidroksil ve peroksil radikallerinin güçlü bir süpürücüsüdür. OH[•] radikalini nötralize edici etkisi glutatyondan 5 kat ve ROO[•] inaktivasyonunda ise E vitamininden 2 kat fazla etkilidir. Melatonin ayrıca inflamatuvar reaksiyonlar sırasında makrofajların aktivasyonu ile oluşan ve toksik bir oksijen türevidir olan (HOCl)'e karşı da süpürücü etki göstermektedir.⁸⁶

Melatoninin serbest radikaller üzerinde dolaylı etkileri de vardır. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, O₂^{-•} radikalini H₂O₂'ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz

aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir.^{83,87}

Antioksidan savunma sistemi ile ilişkili diğer bir enzim sitokrom P450 enzimidir. Bu enzim ksenobiyotik metabolizması aracılığı ile serbest radikal oluşumunu artırır. Melatoninin P450 aktivitesini azaltarak serbest radikal oluşumunu ve dolayısı ile oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir.⁸⁸



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 21.05.2015 tarihli toplantısında 40.2015.mar karar no'lu onayı sonrasında yapıldı (Ek-1). Deney hayvanları, Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHAMER) temin edildi. Yaklaşık 3 aylık erkek, 250-300 gr ağırlığında 32 adet Wistar albino sıçan randomize edilerek eşit sayıda (n=8) dört gruba ayrıldı. Sıçanlar deney süresince 12'şer saatlik aydınlık-karanlık ışıklandırması olan, ısısı 20-22°C ve nemi %45-50 olarak otomatik ayarlanan odalarda yaşatıldı. Bu süreçte tüm sıçanlar şeffaf kafeslerde tutuldu, standart sıçan yemi ile beslendi.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından SAG-C-TUP-080715-0319 nolu proje ile desteklendi.

3.1. Çalışma Grupları

Kontrol (taşıyıcı uygulanan grup) Grup: 8 hafta boyunca normal içme suyu ile beslendi ve 4. haftanın sonundan itibaren 4 hafta boyunca her gün intraperitoneal yoldan melatonin çözücüsü (%0.5 alkol içeren SF) uygulaması yapıldı.

EG grubu: 8 hafta boyunca %0.75 EG içeren içme suyu verildi ve 4. haftanın sonundan itibaren 4 hafta boyunca intraperitoneal yoldan melatonin çözücüsü uygulaması yapıldı.

EG + Melatonin ön uygulama grubu: 8 hafta boyunca %0.75 EG içeren içme suyu verilen hayvanlara EG ile eş zamanlı olarak 8 hafta boyunca 10 mg/kg dozunda melatonin ip uygulandı.

EG + Melatonin tedavi grubu: 8 hafta boyunca %0.75 EG içeren içme suyu verilen hayvanlara 4. haftanın sonundan itibaren 4 hafta boyunca 10 mg/kg dozunda melatonin ip uygulandı.

Çalışma sonunda hayvanlar metabolik kafeslere alınarak 24 saatlik idrar örnekleri toplandı. Bu aşamadan sonra eter anestezisi altında intrakardiyak kan örnekleri alınan hayvanlar dekapite edildi ve böbrek dokuları alınarak histopatolojik ve

biyokimyasal olarak incelendi. İdrar örneklerinde 24 saatlik kalsiyum, oksalat, sitrat ve kreatinin tayinleri ticari kitler ile yapıldı (Şekil 5).



Şekil 5. Metabolik kafeslerde 24 saatlik idrar toplanması.

3.2. Biyokimyasal İncelemeler

3.2.1. GSH düzeyi tayini

Glutatyon (GSH) düzeyleri Beutler ve ark'nın yöntemine göre tayin edildi.⁸⁹ Örneklerin üzerine %15 metafosforik asit ilave edilerek ve 4000rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Üst faz %0.08 DTNB (ditiyo bisnitrobenzoik asit) ile oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi. Oluşan rengin absorbansı 412nm'de okundu. Sonuçlar µg/gr doku olarak ifade edildi.

3.2.2. SOD aktivitesi tayini

Doku homojenatlarında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Mylorie ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı.⁹⁰ 50 mM potasyum fosfat tamponu-EDTA, 0.2mM ribofilavin ve 6mM o-dianisidine kullanılarak hazırlanan tampon ile floresan ışık ve 37°C de bekletilen örneklerde oluşan rengin absorbansı 460 nm'de okundu. Sonuçlar U/gr doku olarak ifade edildi.

3.2.3. MDA düzeylerinin ölçümü

Doku homojenatlarında lipid peroksidasyonu göstergesi olan malondialdehit (MDA) tayini için Beuge ve Aust'un metodu kullanılmıştır.⁹¹ 0.5 ml homojenat üzerine %0.375 g TBA ve %15' lik TCA içeren çözelti ilave edildi. On beş dakika kaynar su banyosunda tutulduktan sonra soğutulan ve santrifüj edilen örneklerin verdiği rengin absorbansı 532 nm'de okundu. Sonuçlar nmol/gr doku olarak ifade edildi.

3.2.4. Oksidatif DNA hasarı ölçümü

Dokularda oksidatif DNA Hasarı, Oxi Select Oxidative DNA Damage Elisa Kit (STA-320, Cell Biolabs) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak ölçüldü. Örneklerden DNA izolasyonu PureLink® Genomic DNA Mini Kit (K182001, Life Technology) kullanılarak prosedürüne uygun olarak yapıldı. Sonuçlar 8-hidroksideoksiguanosin (8-OHdG) ng/mg DNA olarak ifade edildi.

3.2.5. Miyeloperoksidaz Aktivitesi Tayini

Miyeloperoksidaz aktivitesi Hillegass ve ark'nın yöntemine göre yapıldı.⁹² Tayin için gerekli 50 mM K₂HPO₄ (pH: 6) çözeltisi, %0,5'lik HETAB (Hekzadesiltrimetilamonyum bromid), o-dianisidin-2 HCl, %2'lik Sodyum azid, 20mM H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) çözeltileri hazırlandı.

Doku homojenatları 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı, çökeltiyeye 3 ml %0.5' lik HETAB eklendi. Homojenize edildi, 3 kez donduruldu, çözündürülüp sonike edildikten sonra santrifüj edilerek üst faz ile çalışıldı. Üst faz aşağıdaki gibi çalışıldı;

	Kör	Numune
50 mM K₂HPO₄	2.9 ml	2.9 ml
20 mM H₂O₂	0.2 ml	0.2 ml
o-dianisin-2 HCl	0.2 ml	0.2 ml
50 mM K₂HPO₄	0.3 ml	--
Üst faz	--	0.3 ml

Tabloda yer alan şekilde örnek tüpleri hazırlandıktan sonra 37°C'de inkube edildi ve daha sonra reaksiyon %2'lik sodyum azid ile durduruldu. 3000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz alınarak oluşan rengin absorbanı spektrofotometrede 460nm de okundu. MPO için hesaplanmış ekstinksiyon katsayısı 42M⁻¹cm⁻¹ kullanılarak sonuçlar U/mg protein dk cinsinden hesaplandı.

3.2.6. Kaspaz-3 aktivite tayini

Doku homojenatı (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT, 100 mM EDTA, pH:7.4) eklenerek ultrasonik homojenizatör ile 15 saniye %70 amplitüd kullanılarak buz içerisinde patlatıldı. 14.000xg de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant alınarak kaspaz-3 ölçümü için kullanıldı.

Kaspaz-3 aktivite düzeyleri ticari kitler kullanılarak tayin edildi. Ölçüm prensibi kaspaz-3 substratı olan N-Asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid'den (Ac-DEVD-pNA)

kromofor p-nitroanilin (pNA) oluşmasının spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayandırıldı. Serbestleşen pNA'nın absorbansı ELISA okuyucusunda 405 nm'de okunarak bulundu.

3.2.7. Western Blot yöntemiyle Kaspaz-3, iNOS ve MMP-9 protein ekspresyonları tayini

Doku örnekleri Laemli örnek yükleme tamponu kullanılarak 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra 5 dakika boyunca 95°C'de kaynatıldı. %4-%12'lik SDS-PAGE jelleri hazırlanarak jellerin camlar arasında polimerleşmesi sağlandıktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi. Her kuyucuğa 40 µg/ml oranında protein içeren numuneler yüklendi. Örnekler elektroforezde yürütüldükten sonra proteinler PVDF membran kullanılarak yarı kuru sistemle aktarım yapıldı. Membran 2 saat süre ile oda ısısında %5'lik yağsız süt tozu ile bloklandı ve TBST çözeltisi ile yıkandı. 1:300 oranında primer antikor (MMP2 sc-10736, MMP9 sc-10737, TNF-α sc-1351, iNOS sc-651, B-actin sc-47778) ile 4°C'de gece boyu inkübe edildi. Membran TBST yıkaması sonrası HRP konjugatlı sekonder antikor ile 1:2000 oranında oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kaset içerisine yerleştirilen membran üzerine kemilüminesans substrat içeren çözelti (sc-2048) kullanılarak bantların görüntüsü filme aktarıldı. Bantların yoğunluğu image J programı kullanılarak analiz edildi.

3.2.8. Osteopontin gen ekspresyon düzeylerinin SYBR Green ile qRT-PCR ölçülmesi

qRT-PCR ile gen ekspresyon deneyleri SYBR Power SYBR® Green PCR Master Mix (ABI-4368577) kullanılarak prosedüre uygun olarak yapıldı. Öncelikle böbrek dokusundan RNA izole edildi, bu izolasyon için PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen, K1560-02) kullanılarak kit prosedüre uygun olarak yapıldı. İzole edilen RNA'dan cDNA sentezlendi. Elde edilen cDNA'lar osteopontin gen düzeylerimin ölçülmesi için tasarlanan özel primerler kullanılarak qPCR yapıldı.

qRT-PCR reaksiyon içeriği:

2X SYBR Green Supermix	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Steril Su	6.6 µl
cDNA (1:20 dilüe edilmiş)	1.4 µl
Toplam Hacim	20 µl

Örnekler özel mikro plaka kuyucuklarına yüklenerek ağızları sıkıca kapatıldı. Real Time-PCR cihazına yerleştirildi ve gerekli yazılımlar kullanılarak reaksiyon başlatıldı.

Osteopontin için seçilen primerler:

Gen	Primer	Sekans
OPN	F-primer	5'-TGAGTCTGGAAATAACTAATGTGTTT-3'
	R-primer	5'-GAACATAGACATAACCCTGAAGCTT-3'
GAPDH	F-primer	5'-GTGGATATTGTTGCCATC-3'
	R-primer	5'-ACTCATAACAGCACCTCA-3'

Hesaplamalarda referans gen olarak GAPDH kullanıldı. qRT-PCR'nın tüm aşamalarında pozitif kontrol olarak miktarı ve CT (threshold cycle) değeri bilinen cDNA ve negatif kontrol olarak da distile su kullanıldı.

Nükleik asitlerin amplifikasyonları qRT-PCR cihazı kullanılarak tabloda gösterilen döngülerin sıcaklık ve zamanlarına göre gerçekleştirildi.

SYBR Green ile qRT-PCR şartları:

1. Döngü	2. Döngü	40 X	3. Döngü	4. Döngü	5. Döngü	
94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	94 °C	55 °C	4 °C
5 dak	30 sn	30 sn	30 sn	1 dk	1 dk	30dk

Step One Plus System Software kullanılarak yapıldı. Analiz için Applied Biosytem programı kullanıldı. Sonuçlar AU (Arbity Units) olarak elde edildi.

3.2.9. N-asetil-β-glukozaminidaz enzim aktivitesi ölçümü

N-asetil-β-glukozaminidaz (NAG) enzim aktivitesi, ticari kit (Sigma Cs0780) kullanılarak spektrofotometrik metotla ölçüldü.

3.2.10. Histolojik incelemeler

Doku örnekleri %10'luk formole alındıktan sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek (%70-90-96-100) dehidrate edildi. Sonrasında toluende şeffaflaştırılarak parafin içine gömülüp bloklandı. Bloklardan alınmış olan 5 mikrometre kalınlığındaki kesitlere Hematoksilen-Eosin boyası uygulandı ve tüm kesitler Olympus BX51 ışık mikroskobu ile incelendi.

3.2.11. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz Graphpad Prism 5.0 (Graphpad Yazılım, San Diego, Ca, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm veriler ortalama ± ortalamanın standart sapması olarak ifade edildi. Biyokimyasal veri grupları Tukey çoklu karşılaştırma testleri ardından varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmış olup istatistiksel olarak $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İdrar Analiz Sonuçları

Deney sonunda tüm grupların 24 saatlik idrar numunelerinde ölçülen kalsiyum, oksalat, sitrat ve kreatinin düzeyleri Tablo 1.'de yer almaktadır. EG grubunda kalsiyum, sitrat ve kreatinin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken, oksalat düzeyleri ise anlamlı olarak arttı. Kalsiyum, melatonin ön tedavisi alan grupta (Mel+EG+Mel) kontrol değerlere yaklaştı. EG+Mel grubunda ise anlamlı bir artış olmadığı ve kontrole göre yine düşük kaldığı görüldü.

EG grubunda kontrole göre artan oksalat düzeyleri Mel+EG+Mel grubunda anlamlı olarak düzeldi. Benzer şekilde EG grubunda anlamlı artış gösteren sitrat ve kreatinin düzeyleri de Mel+EG+Mel grubunda yine anlamlı olarak düştü.

Tablo 1. 24 saatlik idrar örneklerinde kalsiyum, oksalat, sitrat ve kreatinin düzeyleri.

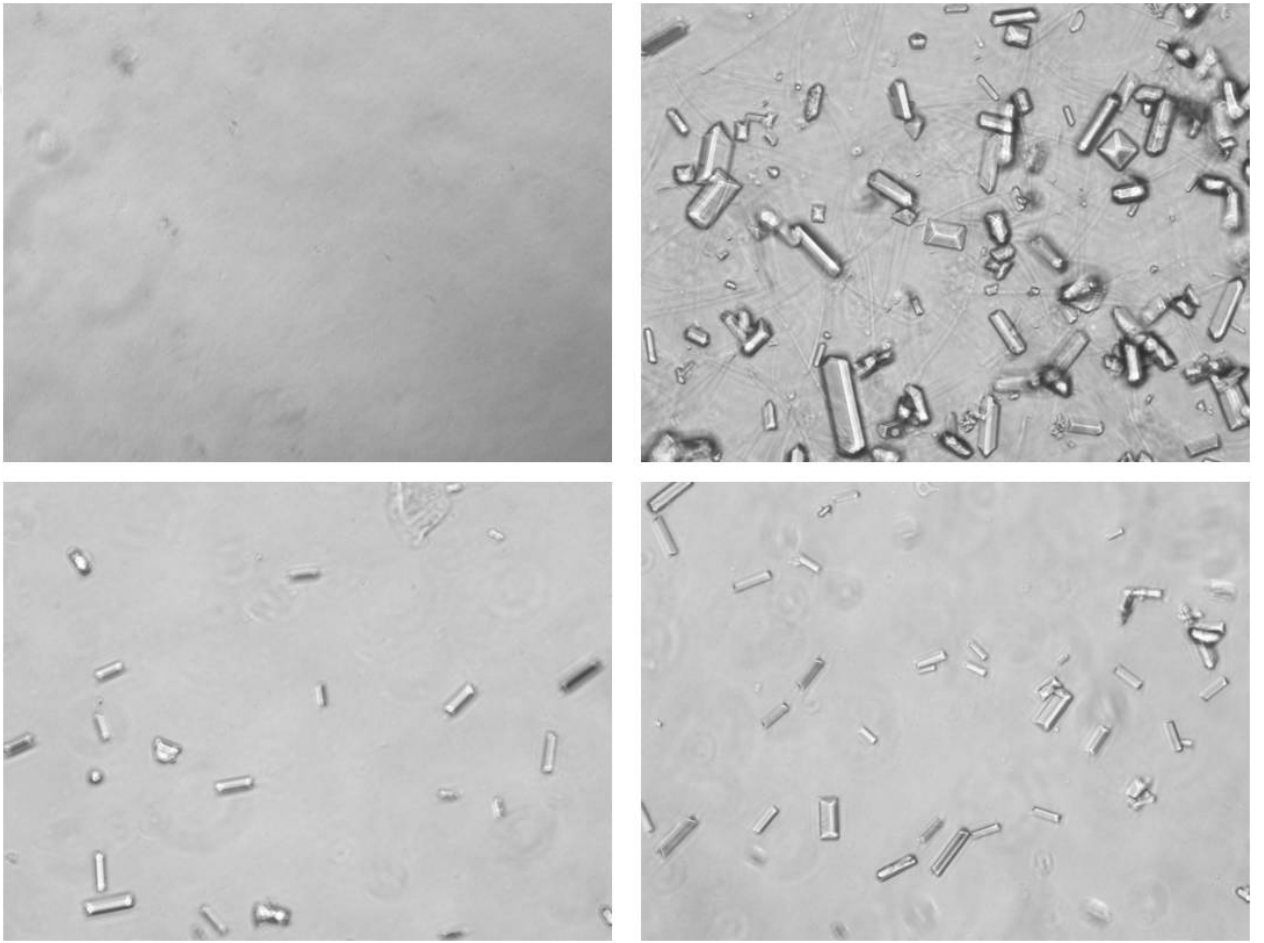
(mg/24 saat)	Kontrol	EG	Mel+EG+Mel	EG+Mel
Kalsiyum	0.41 ± 0.02	0.23 ±0.03 **	0.34 ± 0.03	0.29 ± 0.02 *
Oksalat	0.77 ± 0.13	1.63 ±0.22 *	0.77 ± 0.09 ⁺	1.13 ± 0.30
Sitrat	5.62 ±0.70	1.64 ±0.48 ***	4.77 ± 0.50 ⁺⁺	3.53 ± 0.57
Kreatinin	9.43 ± 0.78	4.52 ±0.54 **	8.25 ± 0.94 ⁺	4.23 ± 0.90 **, &

*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001: Kontrol grubuna göre

⁺p<0.05, ⁺⁺ p<0.01: SF uygulanan EG grubuna göre.

&p<0.05: Ön uygulamalı Melatonin (Mel+EG+Mel) grubuna göre.

İdrar örneklerine invert mikroskopide kalsiyum oksalat kristalleri incelendiğinde EG grubunda taş yoğunluğunun en fazla olduğu buna karşılık melatonin tedavili gruplarda taş yoğunluğunun azaldığı anlaşıldı (Şekil 6). Tedavi grupları içerisinde, profilaktik olarak uygulanan melatonin grubunun (Mel+EG+Mel grubunda), 4 hafta EG'den sonra uygulanan melatonin tedavili gruba göre daha az kristal gösterdiği belirlendi.



Şekil 6. İdrar örneklerinde invert mikroskopi ile taşların görünümü.

4.2 Böbrek Dokusunda Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular

4.2.1. Glutasyon (GSH) ve süperoksid dismutaz (SOD)

Dokunun önemli bir antioksidanı olan redüklenmiş GSH ve önemli bir antioksidan enzim olan SOD düzeyleri, EG uygulaması sonucu tüketildi ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Bu antioksidanların düzeyleri EG ile eş zamanlı uygulanan melatonin tedavisi ile arttı ($p<0.05$). Ancak 4 haftalık EG uygulamasından sonra başlayan melatonin tedavisi ile artmasına rağmen kontrol grubuna göre yine düşük kaldı ($p<0.01-0.001$) (Tablo 2, Şekil 7).

4.2.2. Malondialdehit (MDA) ve myeloperoksidaz (MPO)

Dokuda oksidatif hasarın ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri ve nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan MPO aktivitesi, EG grubunda anlamlı olarak ($p<0.001$) artarken her iki melatonin tedavisi ile anlamlı olarak azaldı ($p<0.05-0.001$) ve kontrol değerlere yaklaştı (Tablo 2, Şekil 8).

4.2.3. Kaspaz-3 aktivitesi ve oksidan DNA hasarı (8-hidroksi guanosin)

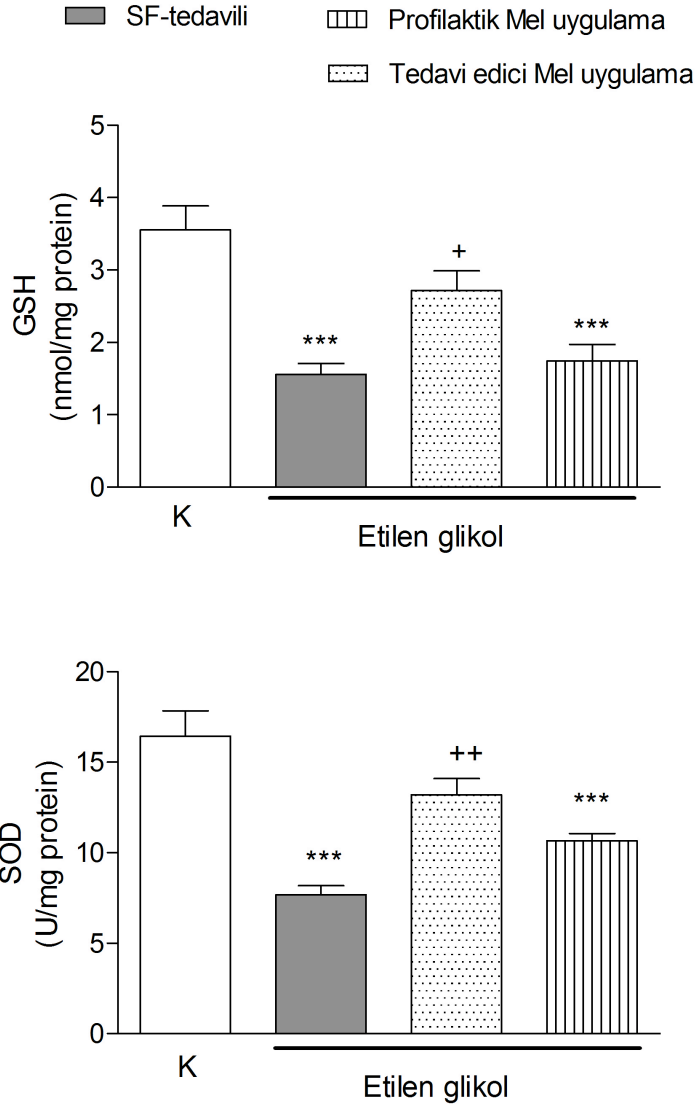
Etilen glikol uygulaması ile oluşan oksidatif hasar, böbrek dokusunda apoptozu uyardı ve kaspaz-3 aktivitesi ve oksidan DNA hasarı (8-OHdG) anlamlı olarak arttı ($p<0.001$). Melatonin ön uygulaması bu artışları anlamlı olarak ($p<0.01-0.001$) baskıladı. Dört haftalık EG'den sonra uygulanan melatonin tedavisi de bu parametrelerde düşüşe neden oldu ($p<0.05$) ancak kontrol grubuna göre yine yüksek kaldı ($p<0.05$) (Tablo 2, Şekil 9).

Tablo 2. Böbrek doku örneklerinde malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), oksidatif DNA [8-hidroksi guanosin (8-OHdG)], miyeloperoksidaz (MPO), süperoksid dismutaz (SOD), ve kaspaz-3aktivitesi bulguları.

	Kontrol	EG	Mel+EG+Mel	EG+Mel
GSH ($\mu\text{mol/g}$)	3.5 ± 0.3	1.6 ± 0.2 ***	2.7 ± 0.3 ⁺	2.1 ± 0.30 **
SOD (U/mg protein)	16.4 ± 1.4	7.6 ± 0.5 ***	12.21 ± 0.8 *, ⁺	10.6 ± 0.4 ***
MDA (nmol/g)	5.6 ± 0.5	12.8 ± 1.0 ***	7.8 ± 0.9 ⁺⁺	8.6 ± 0.9 ⁺
MPO (U/mg protein)	1.8 ± 0.2	5.7 ± 0.6 ***	2.5 ± 0.4 ⁺⁺⁺	2.4 ± 0.3 ⁺⁺⁺
Kaspaz-3 Aktivitesi (U/mg protein)	9.6 ± 0.4	21.8 ± 2.3 ***	13.8 ± 0.7 ⁺⁺	15.7 ± 1.6 *, ⁺
8-OHdG (ng/mg DNA)	2.3 ± 0.3	5.9 ± 0.6 ***	3.2 ± 0.30 ⁺⁺⁺	4.0 ± 0.2 *, ⁺

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: Kontrol grubuna göre.

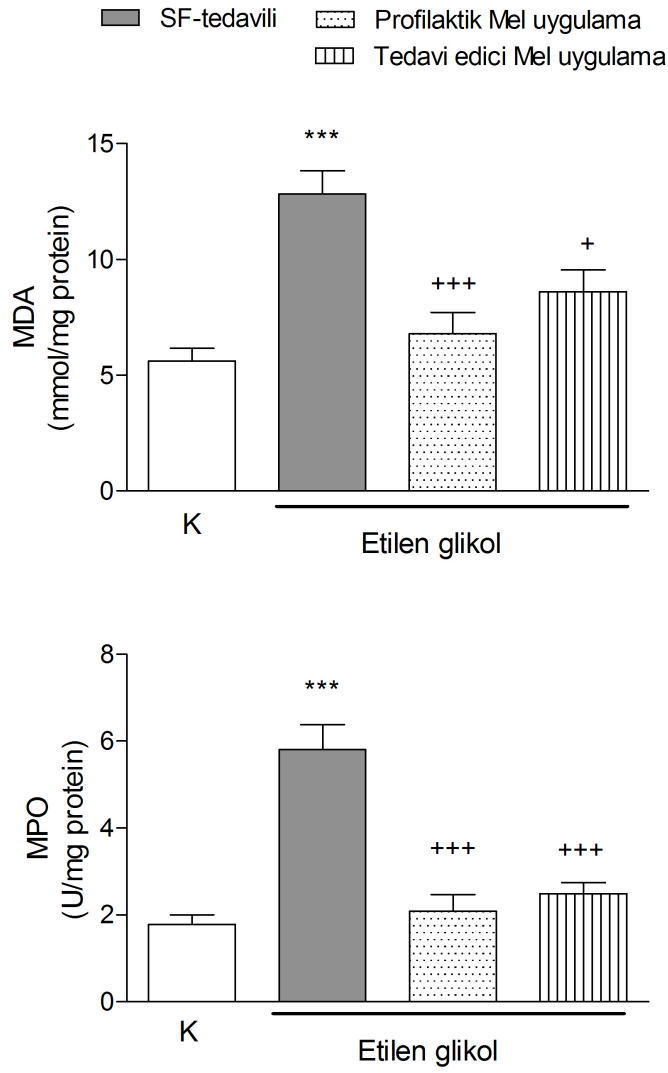
⁺ $p < 0.05$, ⁺⁺ $p < 0.01$, ⁺⁺⁺ $p < 0.001$: SF uygulanan EG grubuna göre.



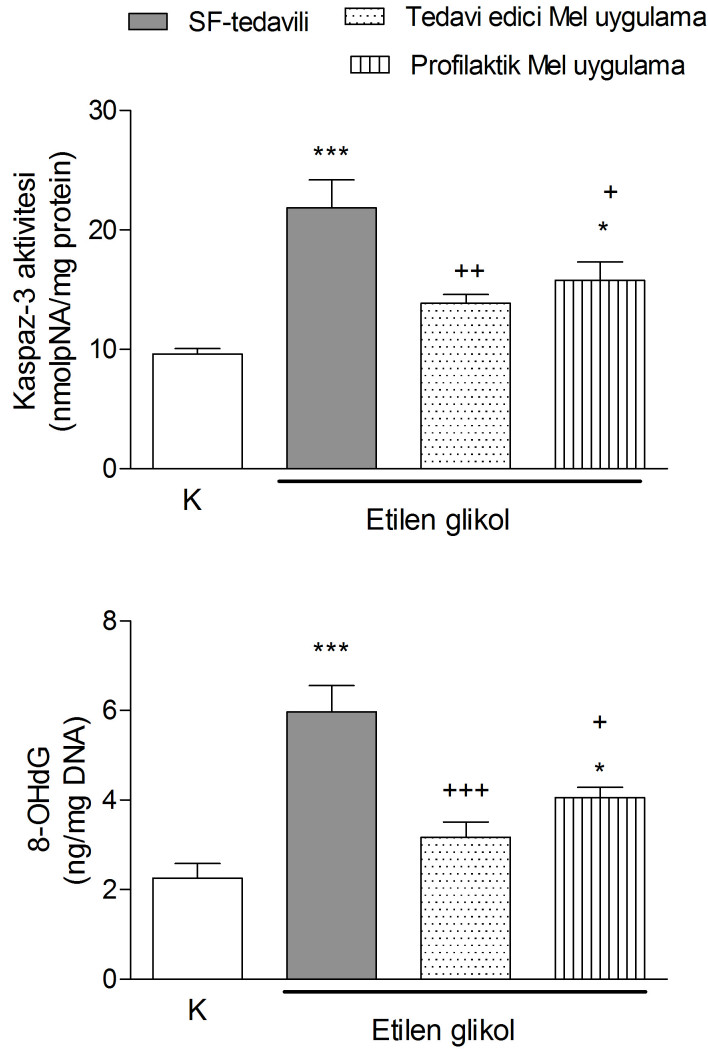
Şekil 7. Böbrek doku örneklerinde glutatyon (GSH) düzeyleri ve süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi bulguları.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: Kontrol grubuna göre.

⁺ $p < 0.05$, ⁺⁺ $p < 0.01$, ⁺⁺⁺ $p < 0.001$: SF uygulanan EG grubuna göre.



Şekil 8. Böbrek doku örneklerinde malondialdehit (MDA) düzeyleri ve myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi bulguları. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: Kontrol grubuna göre
⁺ $p < 0.05$, ⁺⁺ $p < 0.01$, ⁺⁺⁺ $p < 0.001$: SF uygulanan EG grubuna göre.



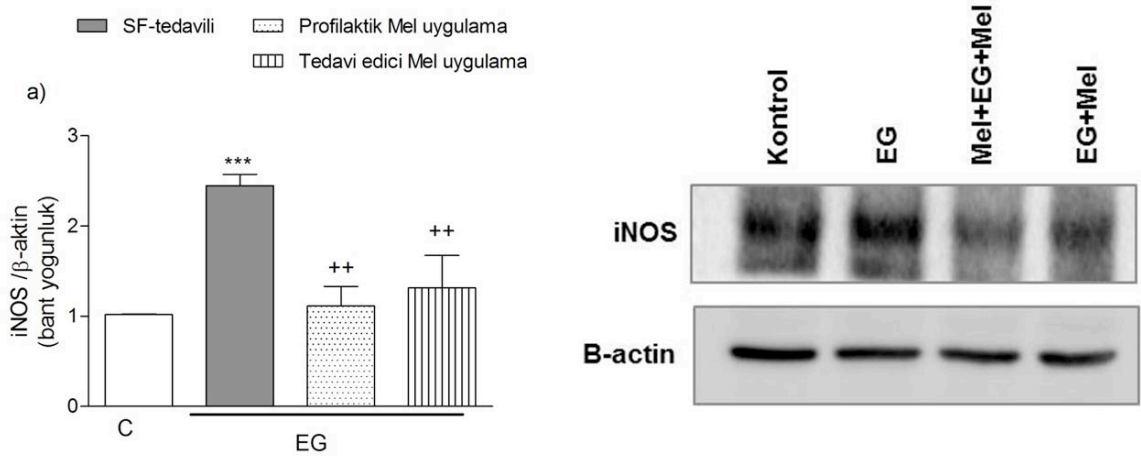
Şekil 9. Böbrek doku örneklerinde kaspaz-3 aktivitesi ve oksidatif DNA hasarı (8-OHdG) bulguları.

*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001: Kontrol grubuna göre.

+p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001: SF uygulanan EG grubuna göre.

4.2.4. iNOS protein ekspresyonu

İnflamasyonla uyarılan NOS aktivitesi (iNOS) EG grubunda anlamlı olarak ($p<0.001$) yüksek bulunurken, melatoninin her iki protokolde de uygulanması iNOS'u azalttı (Şekil 10).



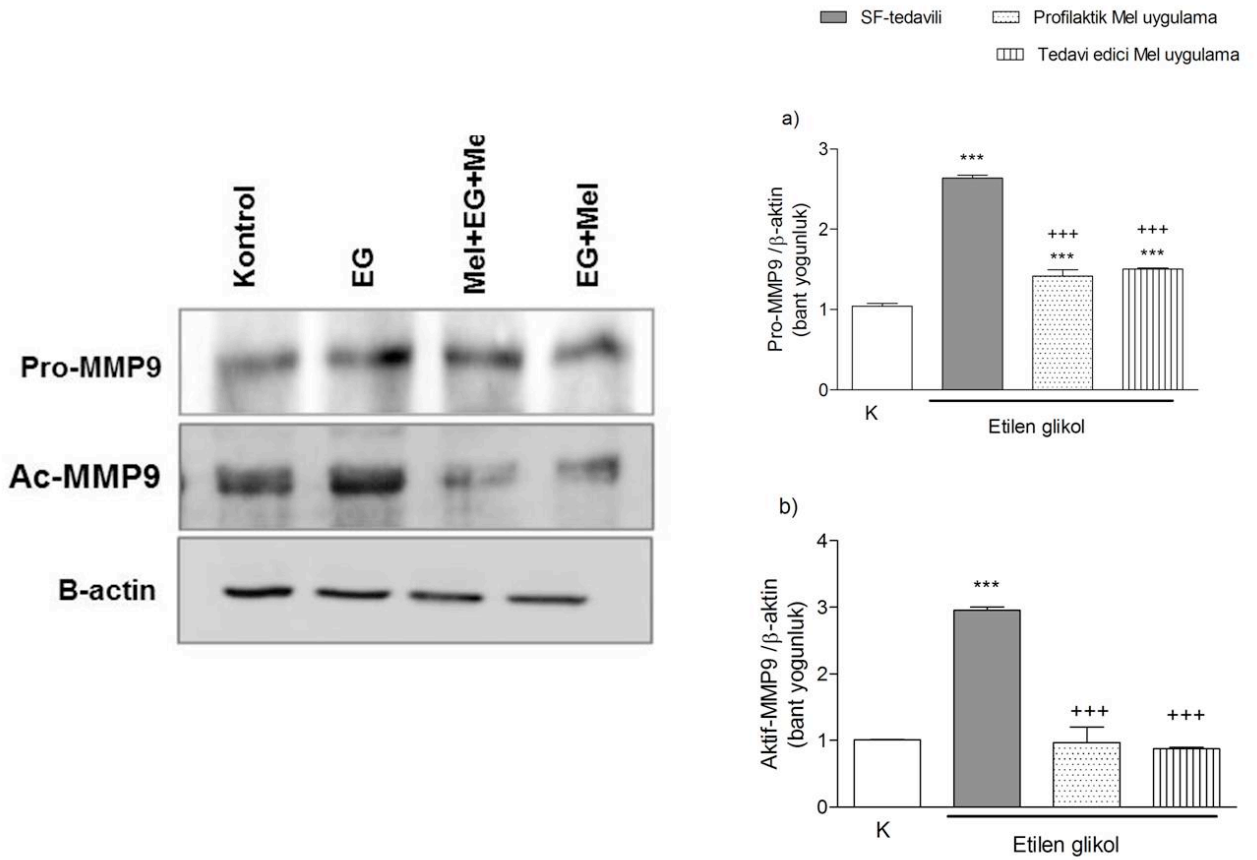
Şekil 10. Böbrek doku örneklerinde a) iNOS, b) Kaspaz-3 ve c) cleaved-Kaspaz aktivitesi ve oksidatif DNA hasarı (8-OHdG) bulguları.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$: Kontrol grubuna göre.

⁺ $p<0.05$, ⁺⁺ $p<0.01$, ⁺⁺⁺ $p<0.001$: SF uygulanan EG grubuna göre .

4.2.5. Matriks metalloproteinaz-9 ekspresyonu

Etilen glikol uygulaması böbrek dokusunda hasarı gösteren MMP-9'un pro- ve aktif formlarını anlamlı olarak ($p<0.001$) arttırdı. Pro-MMP-9, melatonin tedavisi ile azalma gösterdi ancak kontrole yaklaşmadı, buna karşılık melatonin tedavileri aktif MMP-9'u gerek EG ile eş zamanlı uygulamada, gerekse 4 haftalık EG uygulamasından sonra uygulandığında anlamlı olarak ($p<0.001$) düşürdü (Şekil 11).



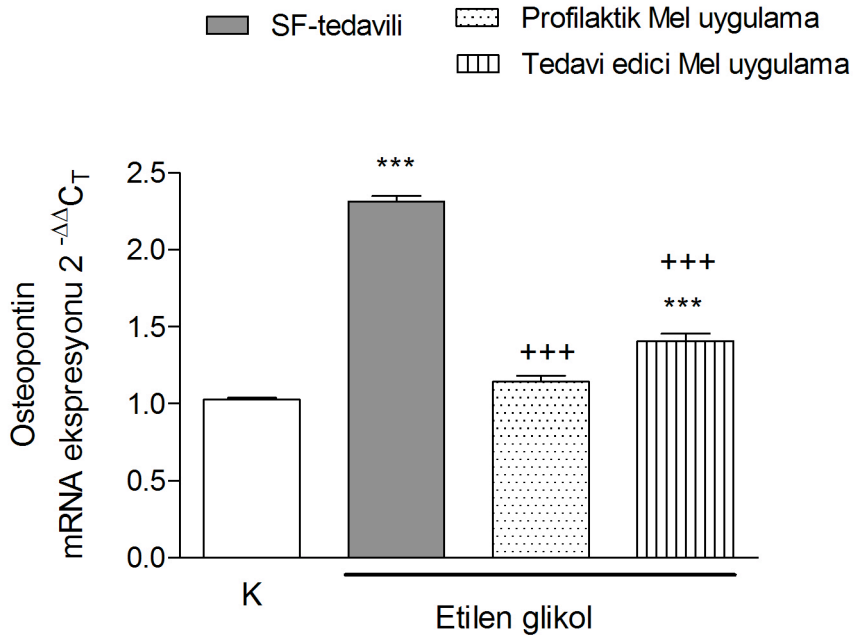
Şekil 11. Böbrek doku örneklerinde MMP-9 protein ekspresyonu Western blot çalışması. a) Pro-MMP-9 ve b) Aktif MMP-9 bant yoğunlukları

*** $p<0.001$: Kontrol grubuna göre.

+++ $p<0.001$: SF uygulanan EG grubuna göre.

4.2.6. Osteopontin gen ekspresyonu sonuçları

Dokuda osteopontin gen ekspresyonunun real time PCR sonuçları gruplar arasında karşılaştırıldığında EG grubunda ekspresyonun anlamlı olarak arttığı ($p<0.001$) profilaktik amaçla ön melatonin uygulaması yapılan grupta bu artışın tamamen baskılandığı, tedavi amaçlı uygulamada ise, EG + Mel grubunda anlamlı olarak azalmakla birlikte kontrole göre yüksek kaldığı gözlemlendi (Şekil 12). Şekil 13 ve 14'te qRT-PCR'da yapılan Osteopontin gen amplifikasyonunun ve melt curve analizi görüntülendi.

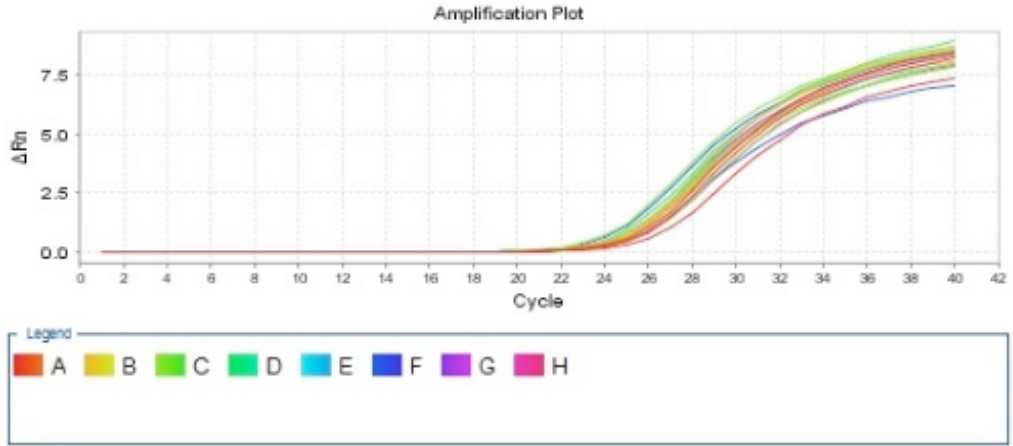


Şekil 12. Böbrek doku örneklerinde osteopontin mRNA gen ekspresyonu.

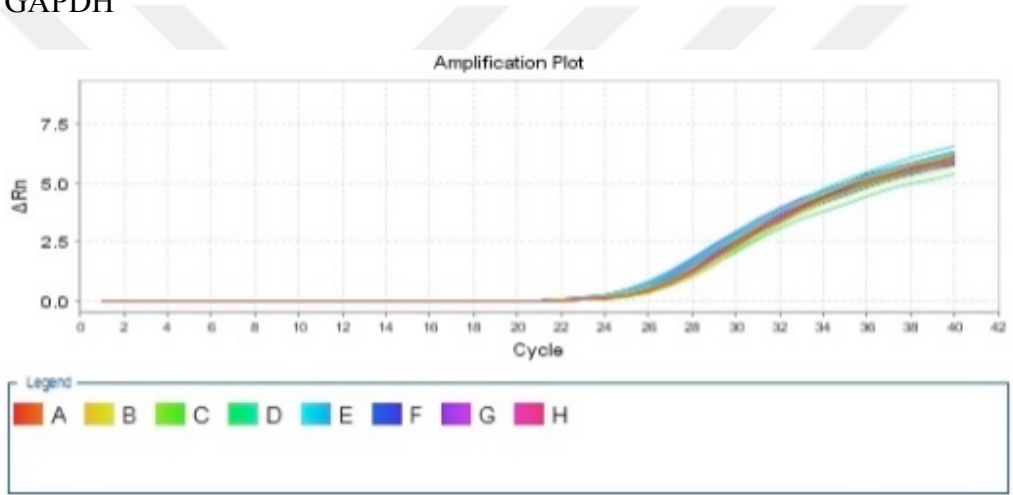
*** $p<0.001$: Kontrol grubuna göre.

+++ $p<0.001$: SF uygulanan EG grubuna göre.

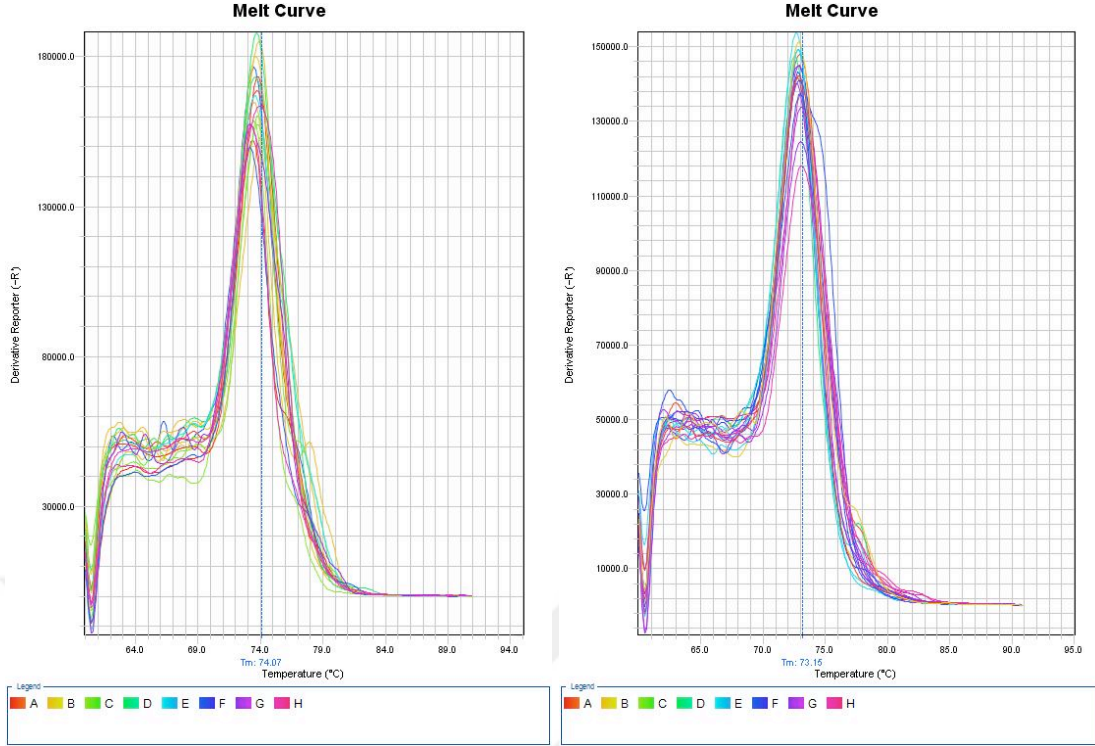
OST



GAPDH



Şekil 13: qRT-PCR’da yapılan Osteopontin gen amplifikasyonunun görüntüsü



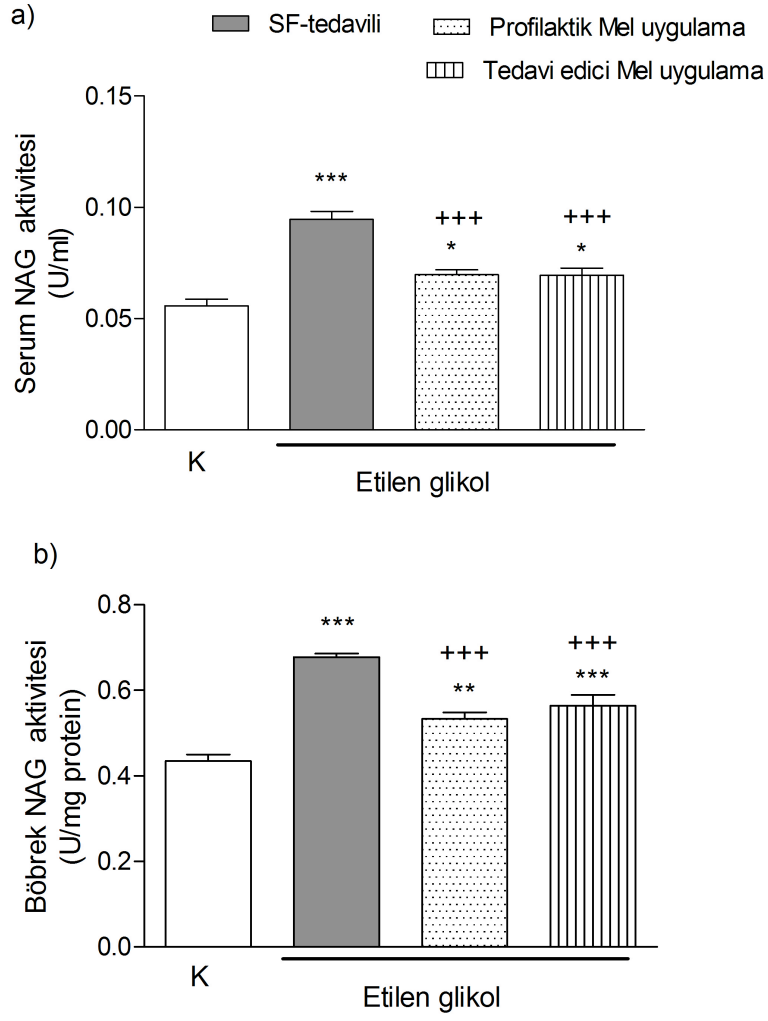
OST

GAPDH

Şekil 14. qRT-PCR’da yapılan osteopontin melt curve analizi görüntüsü

4.2.7. Serumda ve dokuda N-asetil- β -glukozaminidaz enzim aktivitesi sonuçları

Böbrek hasarının göstergesi olan NAG aktivitesi EG grubunda gerek serumda gerek böbrek dokusunda anlamlı olarak ($p < 0.001$) arttı. Melatonin tedavisi gerek profilaktik gerek tedavi edici amaçlarla uygulandığı gruplarda NAG aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek kalmasına rağmen ($p < 0.05-0.001$) EG grubuna göre anlamlı azalmaya neden oldu ($p < 0.001$, Şekil 15).



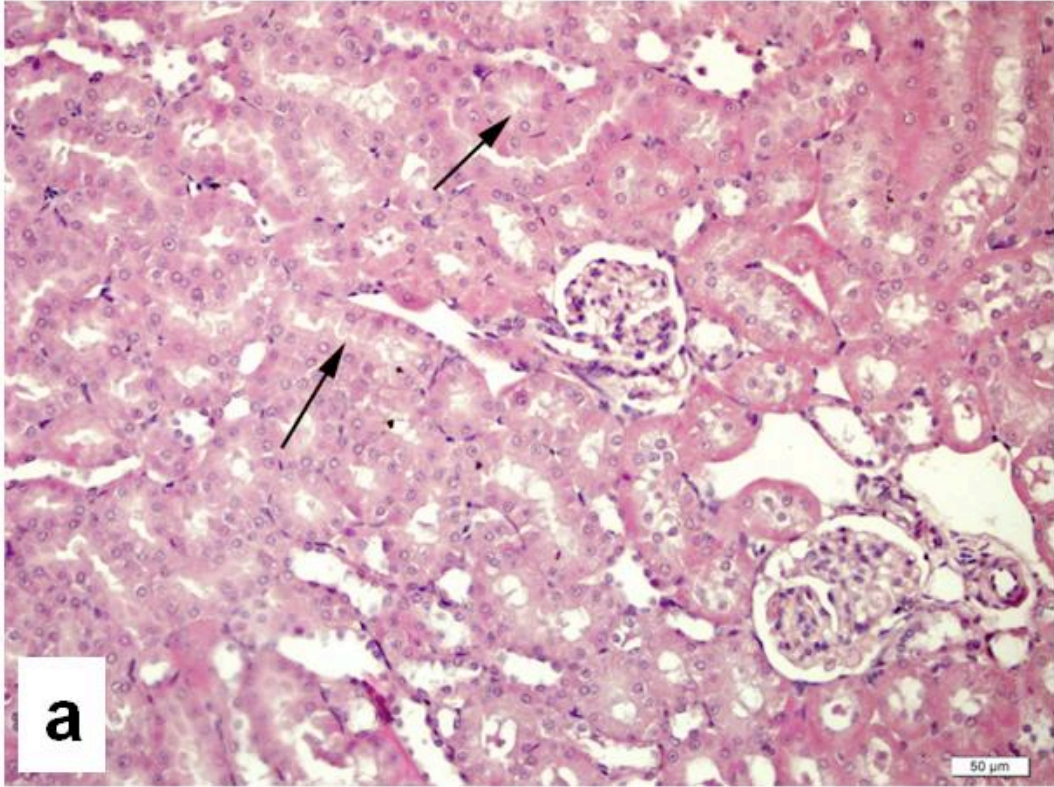
Şekil 15. a) Serumda ve b) böbrek dokusunda N-asetil- β -glukosaminidaz (NAG) aktivitesi bulguları.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: Kontrol grubuna göre.

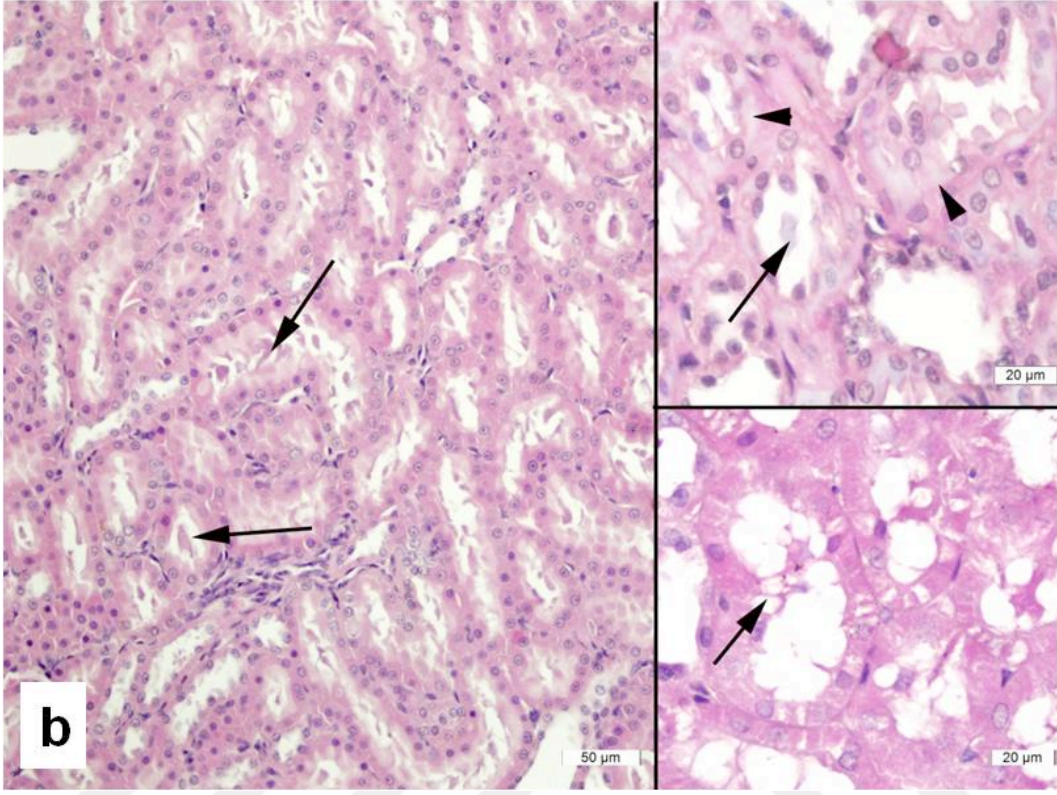
+++ $p < 0.001$: SF uygulanan EG grubuna göre.

4.3. Histolojik Bulgular

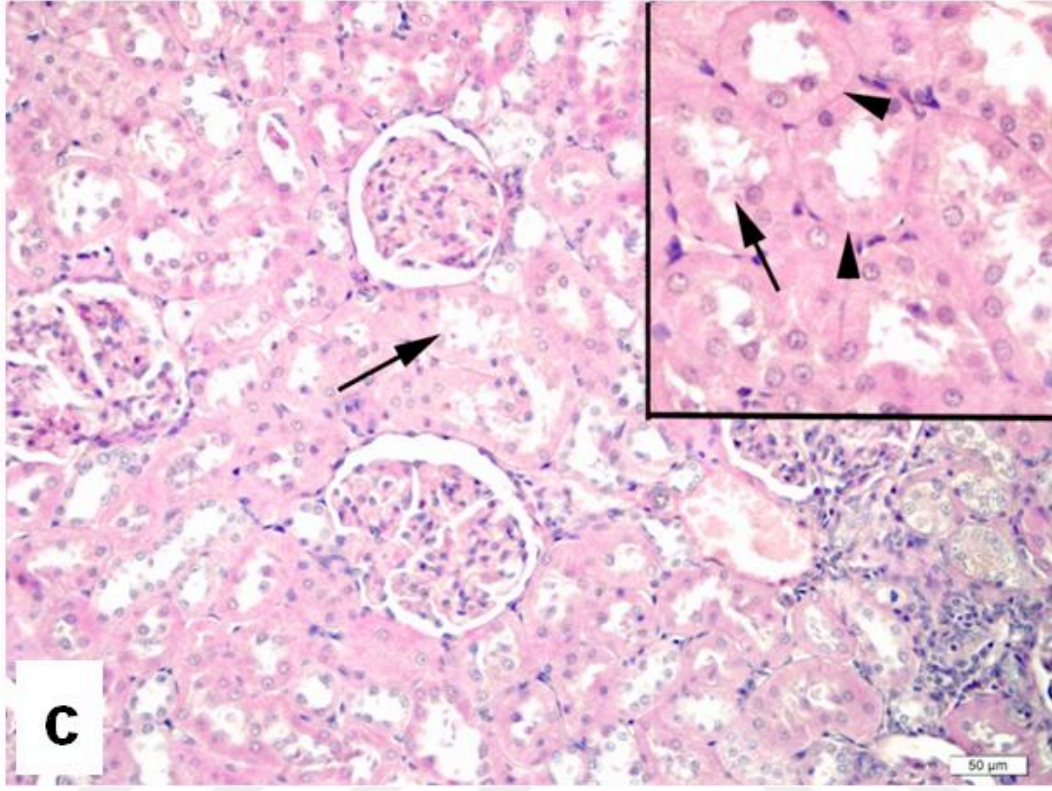
Kontrol grubunda tüm tübüller ve glomerüller düzgün morfoloji sergilemekteydi (Şekil 16 a). Etilen glikol uygulaması ile tübüllerde bazal membran kalınlaşması tübül hücrelerinin bozulması ve lümenine dağılması ile ağır bir dejenerasyon izlendi (Şekil 16 b). Melatonin ön tedavisi grubunda bazal membranda kalınlaşma gerilerken tübül hücrelerinde yer yer dökülme gözlemlendi (Şekil 16 c). Etilen glikol uygulanan ve melatonin tedavisi verilen grupta ise tübül hücrelerindeki dökülmenin oldukça azaldığı izlendi (Şekil 16 d).



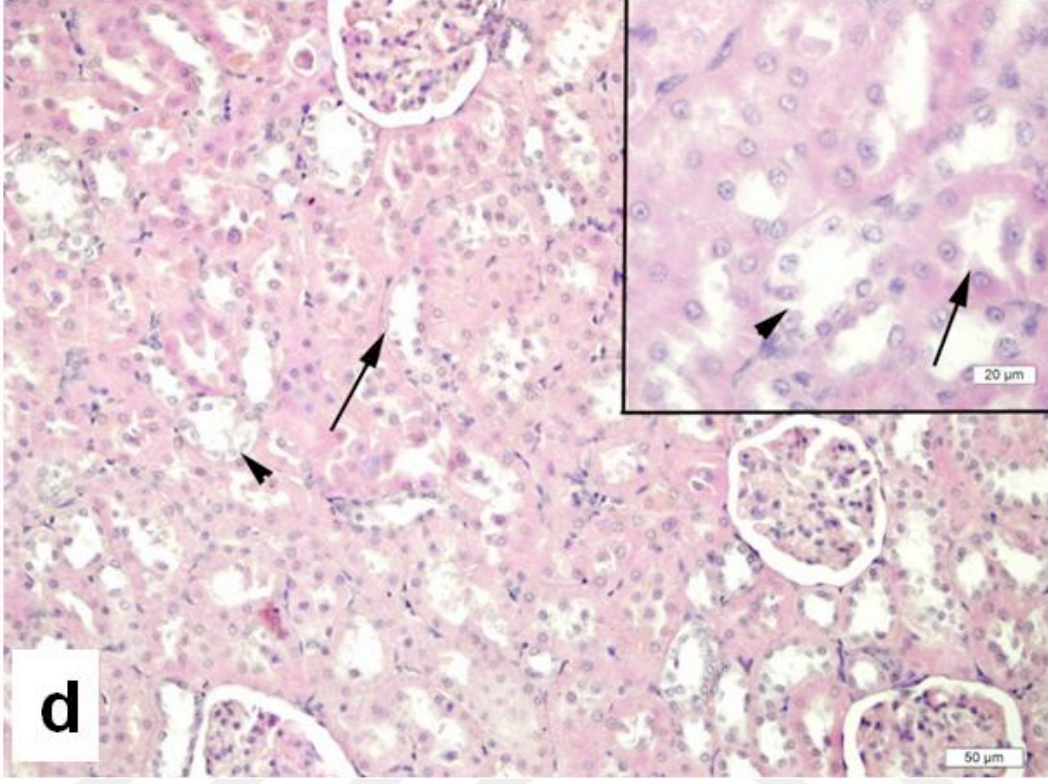
Şekil 16 a. Kontrol grubu, düzgün tübüller (oklar) ve glomerül yapıları.



Şekil 16 b. Etilen glikol uygulaması, tübül hücrelerinin bozulup lümene dökülmesi (oklar) ve kalınlaşmış bazal membran (ok başları)



Şekil 16 c. Profilaktik melatonin uygulaması (Mel + EG + Mel grubu), bazal membranda gerilemiş kalınlaşma (ok başları) yanı sıra oldukça azalmış tübül içi dökülme (oklar)



Şekil 16 d. Tedavi edici melatonin uygulaması (EG + Mel grubu), bazal membranda kalınlaşma gerilemiş (ok başları), tübüller içindeki dökülme yer yer devam etmekte (oklar)

5. TARTIŞMA

Üriner sistem taş hastalığı, idrarın süpersaturasyonu sonucu oluşan ve sık tekrar edici özelliği nedeniyle tedavi stratejilerinin optimize edilmesi gereken önemli bir ürolojik patolojidir. Taş oluşum mekanizmaları incelendiğinde inflamatuvar süreçlerin rolü nedeniyle literatürde antiinflamatuvar ajanların çeşitli deneysel modellerde denendiği görülmüştür. Bu çalışmada etilen glikol ile oluşturulan deneysel taş hastalığı modelinde antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri kanıtlanmış olan melatoninin taş oluşumu üzerindeki ve böbrekteki koruyucu etkileri incelenmiştir. Çalışmamızın sonunda melatoninin, koruyucu amaçla ön uygulaması yapılan sıçanlarda idrarda oksalat, sitrat ve kreatinin düzeylerini kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığı, böbrek dokusunda antioksidan kapasiteyi arttırarak dokuda gelişen inflamasyonu ve oksidatif hasarı azalttığı, biyokimyasal ve histolojik incelemelerle gösterilmiştir.

Etilen glikol ile oluşturulan üriner sistem taş hastalığı modeli, hayvan çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir modeldir. Bu amaçla %0.75'lik EG solüsyonu sıçanların içme suyuna katılır. EG, üriner oksalat ekskresyonunu arttırır aynı zamanda kalsiyum, magnezyum ve sitrat ekskresyonunu da eş zamanlı olarak azaltır ve sonuç olarak idrarda CaOx süpersaturasyonu gelişmektedir. Bu sayede indüklenen kronik hiperoksalüri, şiddetli kristalüriye ve sonuç olarak CaOx taşlarının oluşuma neden olmaktadır.⁹³ Hücre kültürlerinde ve in-vivo deneysel çalışmalarda oksalat kristallerinin neden olduğu hasara lipid peroksidasyonunun eşlik ettiği gösterilmiştir. %0.75 etilen glikol uygulanan hayvanlarda 15, 30 ve 60. günlerde değerlendirilen renal hücre hasarında lipid peroksidlerin arttığı görülmüştür. Bu parametre hücre membran hasarının ve disfonksiyonunun önemli bir göstergesidir. Hücreler lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan savunma sisteminin bileşenleri ile karşı koymaktadır ve bunlardan bazıları superoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimatik veya glutatyon (GSH) gibi non-enzimatik antioksidanlardır.⁹⁴ Bizim çalışmamızda da EG grubunda, böbrek dokusunda lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, melatoninin gerek ön

uygulama yapıldığı koruyucu amaçla uygulanan Mel + EG + Mel grubunda, gerekse melatoninin tedavi edici amaçla uygulandığı EG + Mel grubunda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Melatoninin böbrekte lipid peroksidasyonunu azalttığına dair çalışmalar mevcuttur. Böbrekteki iskemi-reperfüzyon modelinde, sisplatin nefrotoksisitesinde, renovasküler hipertansiyonda ve kronik böbrek yetmezliğinde melatonin uygulamaları böbrek dokusunda MDA düzeylerini düşürmüş ve böbreği korumuştur.⁹⁵⁻⁹⁸ Lipid peroksidasyonu membran yapısını bozarak iyon transportunu ve membranın intrinsek özelliklerini değiştirerek proksimal tübül hücrelerinde hasara yol açmaktadır. Reiter ve ark. melatoninin gerek radikal süpürücü etkisiyle gerekse de antioksidan etkisiyle GSH-Px aktivitesini arttırarak GSH düzeylerini yükselttiği ve dokuyu oksidatif hasara karşı koruduğunu bildirmişlerdir.⁸³ Glutasyon organizmanın en önemli antioksidan moleküllerinden biridir; serbest radikaller ile reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Buna karşılık ROT artışı ise glutasyon depolarının tükenmesine yol açarak dokuyu oksidatif hasara duyarlı hale getirir. Bizim çalışmamızda da EG, böbrek dokusunda GSH seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşürmüştür. Melatonin uygulanan her 2 grupta ise GSH düzeyleri artarak oksidatif hasarı engellemiştir. Benzer şekilde antioksidan bir enzim olan SOD da taş oluşumuna bağlı olarak azalırken melatoninin bu enzimin aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir.

Thamiselvan ve ark.'ın 2002 de yaptığı bir çalışmada membran hasarının CaOx kristallerinin fiksasyonunu hızlandırdığını ve böylece böbrekte taşın büyümesine neden olduğunu ileri sürmüştür. Söz konusu çalışmada SOD, CAT, G-Px, gibi enzimlerin ve GSH, vitamin E, askorbik asit gibi serbest radikal süpürücülerinin düzeyleri düşük bulunmuştur. Oksalat bağlama aktivitesi ve CaOx kristallerinin birikimi, ATPaz aktivitesindeki düşüş ile daha belirgin hale gelmiştir. Ürolitik sıçanlarda Vit E, lipoik asit, methionin, glutasyon esterleri ile tedavilerin hücrel antioksidan düzeylerini normalize ederek lipid peroksidasyon reaksiyonlarını engellediği gösterilmiştir. Antioksidan tedavi sıçan böbreğinde CaOx presipitasyonunu engellemiş, aynı zamanda hiperoksalüriyi azaltmıştır.⁹⁹ Öztürk ve arkadaşları da benzer şekilde %0.7'lik etilen glikol modelinde prepubertal sıçanlarda deneysel ÜSTH'de oksidan hasara SOD, katalaz ve GSH-Px aktivitelerinde azalmanın eşlik ettiğini ve buna karşılık L-arginin ile serbest

radikal oluşumunun, ÜSTH'nin ve sonuçta tübüler hasarın azaldığını göstermişlerdir.¹⁰⁰ Bizim çalışmamızda da, melatonin membran koruyucu etkisi sayesinde CaOx'ın böbrekteki birikimini azaltmış ve dokuyu korumuştur.

Benzer şekilde insanda taş ve antioksidan tedavi ilişkisi Holock ve Tracy tarafından rapor edilmiştir. Sağlık ve beslenme ilişkisinin değerlendirilmesi çalışmaları içinde üriner sistem taşı olan hastalarda renal tübül hücrelerinde oksidatif hasarın rolü değerlendirilmiştir. Çalışma National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) 1988-1994 yaş, cins, ırk, VKİ, diyabet, hipertansiyon gibi hastalığı olan gruplarda taşı olan ve olmayanların karşılaştırılmasıdır. Sonuçta böbrek taşı olan hastalarda alfa karoten ve beta karotenlerin düşük düzeylerinin bulunması, bu hastalarda antioksidan tedavinin taş oluşumunu önleyebileceği yorumunu sağlamıştır.⁷⁵

Myeloperoksidaz enzimi, nötrofil aktivasyonu sonunda salıverilerek serbest radikal üretimine yol açmaktadır. Bu nedenle dokuya nötrofil infiltrasyonunun ve inflamasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir.¹⁰¹ Çeşitli böbrek hasarı modellerinde MPO artışının oksidatif hasara eşlik ettiği gösterilmiştir.^{95, 102-104} Buna karşılık melatoninin MPO aktivitesini baskıladığı da bilinmektedir. Reiter ve ark., 2000 yılında yazdıkları derlemede melatoninin antioksidan etkisinin nötrofil infiltrasyonunu azaltarak ve nötrofil aktivasyonunu engelleyerek etki gösterdiğini açıklamışlardır.⁸⁷ Literatürde üriner sistem taş hastalığı modellerinde MPO aktivitesi ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Mushtaq ve ark. CaOx taşları birikimi ile birlikte MPO aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir.¹⁰⁵ Bizim çalışmamızda da EG grubunda artan MPO aktivitesi, taş oluşumuna inflamasyonun eşlik ettiği bulgusunu desteklerken, melatonin uygulaması ile bu artış engellenmiştir. Benzer şekilde inflamasyonun diğer göstergelerinden biri olan inflamasyon ile uyarılan NOS aktivitesi de EG uygulanan grupta yüksek bulunmuş olup antiinflamatuvar ajan olan melatonin uygulaması ile baskılanmıştır.

Kalsiyum oksalat taşı oluşumu sürecinde renal tübüllerde hasar ve apoptoz görüldüğü in-vivo ve in-vitro çalışmalarda gösterilmiştir.^{106, 107} Taguchi ve arkadaşları 2012'de %1 etilen glikol uygulanan sıçanlarda böbrekte kristal formasyonunu, hücre hasarını, apoptozis ve oksidatif hasarda artışı gösterirken bu sıçanlarda antioksidan

özelliği bilinen pioglitazon tedavisinin bu parametreleri geri çevirdiğini göstermişlerdir. İlgili çalışmada oksidatif hasar, N-asetil-β-glukozaminidaz, 8-hidroksiguanozin gibi parametrelerle desteklenmiştir. Araştırmacılar pioglitazonun kristal oluşumunu engelleyici etkilerine bu ajanın antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin aracılık ettiğini belirtmektedir.⁷¹ Bizim alışmamızda da EG uygulaması ile oluşan 8-OHdG düzeyleri ile NAG ve kaspaz-3 aktivitelerinde gözlenen artış bu bulgular ile uyum göstermektedir. Melatonin tedavisi ise profilaktik Mel uygulaması yapılan grupta kaspaz aktivitesini ve 8-OHdG düzeylerini kontrol grubu değerlerine yaklaştırırken tedavi edici Mel uygulaması ile anlamlı düşüş göstermesine rağmen kontrol değerlerine göre yüksek kalmıştır. Çalışmamızda dokuda izlenen önemli hasar parametrelerinde iki ayrı uygulamada gözlenen bu farklılık melatoninin profilaktik kullanımının önemini göstermektedir. Diğer taraftan melatoninin EG uygulamasına bağlı olarak gerek serumda gerek böbrek dokusunda tübüler hasar göstergesi olan NAG aktivitelerindeki artış her iki uygulama ile de baskılanmıştır. Çalışmamızda melatoninin gerek profilaktik gerek tedavi edici amaçla uygulanması ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde bazı parametrelerde her iki uygulama ile benzer etkili sonuçlar elde edilirken bazı parametreler ön uygulamanın, tedavi edici uygulamaya göre daha etkin şekilde koruma sağladığını göstermiştir.

Hiperoksaluri ve CaOx kristal birikimi, böbrekte çeşitli morfolojik ve patolojik değişimlere neden olmakta ve idrar bileşimini değer değiştirmektedir.²³ Bu değer işimler, renal hücrelerin yüksek oksalat ve CaOx kristallerine karşı verdiği inflamatuvar yanıt aracılığıyla olmaktadır. Bu inflamatuvar yanıtta da OPN, inter-alfa inhibitör (Iα-I), alfa-1-mikroglobülin, kalgranulin, heparan sülfat ve matriks glaprotein-33 sayılmaktadır.¹⁰⁸ Taş oluşumunda mineralizasyon oluşum inhibitörlerinin vücutta üretiminin artması beklenebilir. Örneğin inflamasyon ve fibroziste rol oynayan OPN mineralizasyon inhibitörüdür ve kemoatraktandır. Osteopontin, öncelikle kristalleşmeyi inhibe etmek ve mineral oluşmuş ise inflamatuvar hücreleri o bölgeye çekerek kristalleri elimine etmek için etkisini gösterir. Dolayısıyla OPN mineralizasyon inhibitörü olmasına rağmen inflamatuvar döngü içindeki rolüyle böbrekte hasara yol açar. Çünkü inflamasyon,

fagositik NADPH oksidaz aktivasyonuna ve böylece ROT üretimine yol açarak olayı kısır döngüye sokar.²³

Osteopontinin inflamasyon ve böbrek hasarı ile ilişkisi üriner sistem taş hastalığının yanı sıra diyabetik sıçanlarda ve cerrahi olarak oluşturulmuş kronik böbrek yetmezliği oluşturulan sıçanlarda çalışılmış ve OPN mRNA ve protein miktarlarında önemli ölçüde artış olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar, glomerüler ve tübüler OPN ekspresyonunun makrofaj birikimine ve progresif renal hasara eşlik ettiğini ve renal fonksiyon bozukluklarına neden olduğunu bildirmişlerdir.⁸¹ Bu patolojik durumlarda inflamasyonun artan anjiyotensine bağlı olduğu ve anjiyotensin reseptör-1 antagonistleri ve ACE inhibitörlerinin OPN ekspresyonunu ve inflamasyonu baskılayarak koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir.⁸¹ Bizim çalışmamızda da osteopontin mRNA ekspresyonu EG uygulanan grupta anlamlı olarak artmış olup, tedavi amacıyla uygulanan melatonin grubunda anlamlı azalma göstermekle birlikte ulaşılan bu değerler kontrol grubuna göre yüksek kalmıştır. Buna karşılık profilaktik melatonin uygulanan grupta ise OPN mRNA ekspresyonu kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır. Bu sonuçlar melatoninin antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklerini desteklemektedir.

Çeşitli böbrek hastalıklarının patogenezinde mezengial hücreler tarafından ekstraselüler matriks artışı söz konusudur. Glomerüllerde ekstraselüler matriks yıkımının başlıca düzenleyicileri matriks metalloproteinazlardır (MMP). Matriks metalloproteinazlar çinko bağımlı endoproteinazlardır. Matriks metalloproteinazlar, ekstraselüler matriks komponentlerinin yıkımından sorumlu olup yara iyileşmesi, anjiyogenez, hücre göçü, dokunun yeniden şekillenmesi gibi süreçlerde önemli rol oynamaktadır. MMP ekspresyonundaki değişimler ciddi patolojik durumlara sebep olur. Böbrekte ekstraselüler matriks proteinlerinin homeostatik döngüsündeki bozulma, glomerüler filtrasyonun bozulmasına yol açmakta ve glomeruloskleroz gibi progresif böbrek hastalıklarına yol açmaktadır. TNF-a, interlökin-1 β (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından indüklenen MMP ekspresyonundaki artış, olayın inflamasyon boyutunu göstermektedir. Jelatinaz olarak bilinen MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonlarındaki artış glomerüler mezangial hücrelerde inflamasyonun arttığının

göstergesidir. MMP-9'un artışının sitokinler tarafından indüklendiği kabul edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında mezangial hücrelerde NO düzeylerindeki artışa proinflamatuvar sitokinlerdeki artışın eşlik ettiği ve iNOS ekspresyonunun da arttığı bildirilmiştir.¹⁰⁹ Tan ve ark. BALB/c türü farelerde oluşturdukları ünilateral üreteral obstrüksiyon modelinde renal MMP-9 ekspresyonunu incelemişlerdir. Bu farelere MMP-9 antikoru uygulandığında MMP-9 aktivitesinin baskılandığı ve makrofaj infiltrasyonunun, ekstraselüler matriks oluşumunun ve fibrozisin azaldığını bildirmişlerdir.¹¹⁰

Araştırmalar, inflamatuvar hücrelerin, MMP-2 ve MMP-9 gibi proteinolitik enzimler ürettiğini ve bu sayede ekstraselüler matriksin yıkımı ile kalsifikasyonun başladığını bildirmişlerdir. Khan ve ark. da bu bilgiler doğrultusunda MMP aktivitesindeki artışın CaOx taşları ile ilişkisini incelemişlerdir. MMP aktivitesi ile yüzey bütünlüğünün bozulması sonucunda matriks bağlantılı CaOx nükleasyonu başlamakta ve aynı zamanda yüzeyde bulunan kalsiyum fosfat kristallerinin CaOx kristallerine dönüşümü gerçekleşmektedir.¹¹¹ Bu çalışma inflamasyon, MMP ve ÜSTH ilişkisini gösteren en güncel çalışmalardan biridir. Biz de çalışmamızda EG uygulaması ile böbrek dokusunda MMP-9'un pro- ve aktif formlarının ekspresyonunun anlamlı olarak arttığını gördük. Bu bulgu, yukarıda da belirtilen, çalışmamızın diğer inflamatuvar parametreleri olan MPO, iNOS artışına eşlik etmektedir. Buna karşılık her iki farklı uygulamada da melatonin güçlü antiinflamatuvar etkisi ile bu parametreleri baskılamıştır. Esposito ve ark. böbrekteki tübüler fonksiyonları düzenleyen spesifik melatonin reseptörlerindeki bozukluğun tekrarlayan kalsiyum taşları ile ilişkisini göstermişlerdir.¹¹² Ancak literatürde deneysel üriner sistem taş modellerinde melatonin uygulaması ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamız bu konuda yapılmış ilk çalışmadır.

6. SONUÇLAR

Deneysel ve klinik çalışmalar böbrek taşlarının oluşumunda oksidatif stresin ve inflamasyonun önemini vurgulayan sonuçlar vermiştir. İnflamasyon, taş oluşum sürecinin başlangıcında kristalizasyonun inhibisyonunu ve taş oluşumunun önlenmesini sağlamaktadır. Ancak inflamatuvar ortamda artan ROT nedeniyle antioksidan kapasitenin zayıflaması ve idrarda gelişen süpersatürasyon, kristalizasyonu giderek arttırarak taş hastalığına yol açmaktadır. Buna karşılık antioksidanlar ile tedaviyle, ROT üretiminin ve CaOx kristal depolanmasının azaldığı kanıtlanmıştır. Ayrıca böbreğin antioksidanlar ile korunması ve antioksidan kapasitesinin artırılması, kronik böbrek yetmezliği gibi böbrekte taşa bağlı gelişebilecek hastalıklara karşı da koruyucu olacaktır.

Çalışmamız, güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar madde olan melatoninin özellikle profilaktik ve ayrıca tedavi edici amaçla uygulanması ile böbrek taşı oluşumunu azaltabileceğini ve taşa bağlı oluşacak hasarı engelleyebileceğini göstermiştir. Melatoninin düşük yan etki profili de göz önüne alındığında, taş hastalığı için riskli olan popülasyonlarda bu ajanın koruyucu amaçlı kullanımının alternatif bir yaklaşım oluşturması desteklenmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Lopez M, Hoppe B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatric nephrology*. 2010 Jan;25(1):49-59. PubMed PMID: 21476230. Pubmed Central PMCID: 2778769.
2. Cambareri GM, Kovacevic L, Bayne AP, et al. National multi-institutional cooperative on urolithiasis in children: Age is a significant predictor of urine abnormalities. *Journal of pediatric urology*. 2015 Aug;11(4):218-23. PubMed PMID: 26119451.
3. Dwyer ME, Krambeck AE, Bergstralh EJ, Milliner DS, Lieske JC, Rule AD. Temporal trends in incidence of kidney stones among children: a 25-year population based study. *The Journal of urology*. 2012 Jul;188(1):247-52. PubMed PMID: 22595060. Pubmed Central PMCID: PMC3482509.
4. Habbig S, Beck BB, Hoppe B. Nephrocalcinosis and urolithiasis in children. *Kidney international*. 2011 Dec;80(12):1278-91. PubMed PMID: 21956187.
5. Hernandez JD, Ellison JS, Lendvay TS. Current Trends, Evaluation, and Management of Pediatric Nephrolithiasis. *JAMA Pediatr*. 2015 Aug 24. PubMed PMID: 26302045.
6. Novak TE, Lakshmanan Y, Trock BJ, Gearhart JP, Matlaga BR. Sex prevalence of pediatric kidney stone disease in the United States: an epidemiologic investigation. *Urology*. 2009 Jul;74(1):104-7. PubMed PMID: 19428065.
7. Norlin A, Lindell B, Granberg PO, Lindvall N. Urolithiasis. A study of its frequency. *Scandinavian journal of urology and nephrology*. 1976;10(2):150-3. PubMed PMID: 948724.
8. Scales CD, Jr., Smith AC, Hanley JM, Saigal CS, Urologic Diseases in America P. Prevalence of kidney stones in the United States. *European urology*. 2012 Jul;62(1):160-5. PubMed PMID: 22498635. Pubmed Central PMCID: PMC3362665.

9. Sierakowski R, Finlayson B, Landes RR, Finlayson CD, Sierakowski N. The frequency of urolithiasis in hospital discharge diagnoses in the United States. *Investigative urology*. 1978 May;15(6):438-41. PubMed PMID: 649290.
10. Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA, Nyberg LM, Curhan GC. Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976-1994. *Kidney international*. 2003 May;63(5):1817-23. PubMed PMID: 12675858.
11. Pearle MS, Calhoun EA, Curhan GC, Urologic Diseases of America P. Urologic diseases in America project: urolithiasis. *The Journal of urology*. 2005 Mar;173(3):848-57. PubMed PMID: 15711292.
12. Dursun M, Ozbek E, Otunctemur A, Sahin S, Cakir SS. Clinical presentation of urolithiasis in older and younger population. *Archivio italiano di urologia, andrologia : organo ufficiale [di] Societa italiana di ecografia urologica e nefrologica / Associazione ricerche in urologia*. 2014 Dec;86(4):249-52. PubMed PMID: 25641444.
13. Gillen DL, Worcester EM, Coe FL. Decreased renal function among adults with a history of nephrolithiasis: a study of NHANES III. *Kidney international*. 2005 Feb;67(2):685-90. PubMed PMID: 15673317.
14. Jungers P, Joly D, Barbey F, Choukroun G, Daudon M. ESRD caused by nephrolithiasis: prevalence, mechanisms, and prevention. *Am J Kidney Dis*. 2004 Nov;44(5):799-805. PubMed PMID: 15492945.
15. Maeda S, Naganuma T, Takemoto Y, Shoji T, Okamura M, Nakatani T. Chronic kidney disease in urolithiasis patients following successful extracorporeal shockwave lithotripsy. *Mol Med Rep*. 2012 Jan;5(1):3-6. PubMed PMID: 21922140.
16. Worcester EM, Parks JH, Evan AP, Coe FL. Renal function in patients with nephrolithiasis. *The Journal of urology*. 2006 Aug;176(2):600-3; discussion 3. PubMed PMID: 16813897.
17. Sirin A, Emre S, Alpay H, Nayir A, Bilge I, Tanman F. Etiology of chronic renal failure in Turkish children. *Pediatric nephrology*. 1995 Oct;9(5):549-52. PubMed PMID: 8580006.

18. Hesse A, Brandle E, Wilbert D, Kohrmann KU, Alken P. Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs. 2000. *European urology*. 2003 Dec;44(6):709-13. PubMed PMID: 14644124.
19. Aggarwal KP, Narula S, Kakkar M, Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. *BioMed research international*. 2013;2013:292953. PubMed PMID: 24151593. Pubmed Central PMCID: 3787572.
20. Dardamanis M. Pathomechanisms of nephrolithiasis. *Hippokratia*. 2013 Apr;17(2):100-7. PubMed PMID: 24376311. Pubmed Central PMCID: PMC3743610.
21. Xie B, Halter TJ, Borah BM, Nancollas GH. Aggregation of Calcium Phosphate and Oxalate Phases in the Formation of Renal Stones. *Crystal growth & design*. 2015 Jan 7;15(1):204-11. PubMed PMID: 25598742. Pubmed Central PMCID: 4291782.
22. Baumann JM, Affolter B. From crystalluria to kidney stones, some physicochemical aspects of calcium nephrolithiasis. *World journal of nephrology*. 2014 Nov 6;3(4):256-67. PubMed PMID: 25374820. Pubmed Central PMCID: 4220359.
23. Khan SR. Reactive oxygen species as the molecular modulators of calcium oxalate kidney stone formation: evidence from clinical and experimental investigations. *The Journal of urology*. 2013 Mar;189(3):803-11. PubMed PMID: 23022011.
24. Randall A. The Origin and Growth of Renal Calculi. *Ann Surg*. 1937 Jun;105(6):1009-27. PubMed PMID: 17856988. Pubmed Central PMCID: PMC1390483.
25. Peacock M, Knowles F, Nordin BE. Effect of calcium administration and deprivation on serum and urine calcium in stone-forming and control subjects. *Br Med J*. 1968 Jun 22;2(5607):729-31. PubMed PMID: 5656279. Pubmed Central PMCID: PMC1991649.

26. Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ. Clinical and metabolic aspects of urinary stone disease in Leeds. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 1980;53:199-206. PubMed PMID: 7010570.
27. Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ, Hanes FA. Epidemiological risk factors in calcium stone disease. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 1980;53:15-30. PubMed PMID: 6937991.
28. Robertson WG, Peacock M, Nordin BE. The significance of crystalluria in renal stone formation. *The British journal of surgery.* 1969 May;56(5):388-9. PubMed PMID: 5781083.
29. Pak CY, Adams-Huet B. Elucidation of factors determining formation of calcium phosphate stones. *The Journal of urology.* 2004 Dec;172(6 Pt 1):2267-70. PubMed PMID: 15538246.
30. Pak CY, Adams-Huet B, Poindexter JR, Pearle MS, Peterson RD, Moe OW. Rapid Communication: relative effect of urinary calcium and oxalate on saturation of calcium oxalate. *Kidney international.* 2004 Nov;66(5):2032-7. PubMed PMID: 15496176.
31. Pak CY, Poindexter JR, Peterson RD, Heller HJ. Biochemical and physicochemical presentations of patients with brushite stones. *The Journal of urology.* 2004 Mar;171(3):1046-9. PubMed PMID: 14767267.
32. Fasano JM, Khan SR. Intratubular crystallization of calcium oxalate in the presence of membrane vesicles: an in vitro study. *Kidney international.* 2001 Jan;59(1):169-78. PubMed PMID: 11135069.
33. Kok DJ. Intratubular crystallization events. *World journal of urology.* 1997;15(4):219-28. PubMed PMID: 9280050.
34. Umekawa T, Iguchi M, Kurita T. The effect of osteopontin immobilized collagen granules in the seed crystal method. *Urological research.* 2001 Aug;29(4):282-6. PubMed PMID: 11585285.
35. Kok DJ, Khan SR. Calcium oxalate nephrolithiasis, a free or fixed particle disease. *Kidney international.* 1994 Sep;46(3):847-54. PubMed PMID: 7996806.

36. Khan SR, Shevock PN, Hackett RL. Acute hyperoxaluria, renal injury and calcium oxalate urolithiasis. *The Journal of urology*. 1992 Jan;147(1):226-30. PubMed PMID: 1729537.
37. Thamilselvan S, Khan SR. Oxalate and calcium oxalate crystals are injurious to renal epithelial cells: results of in vivo and in vitro studies. *J Nephrol*. 1998 Mar-Apr;11 Suppl 1:66-9. PubMed PMID: 9604816.
38. Verkoelen CF, van der Boom BG, Houtsmuller AB, Schroder FH, Romijn JC. Increased calcium oxalate monohydrate crystal binding to injured renal tubular epithelial cells in culture. *Am J Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 2):F958-65. PubMed PMID: 9612335.
39. Lieske JC, Walsh-Reitz MM, Toback FG. Calcium oxalate monohydrate crystals are endocytosed by renal epithelial cells and induce proliferation. *Am J Physiol*. 1992 Apr;262(4 Pt 2):F622-30. PubMed PMID: 1566875.
40. Knoll T, Steidler A, Trojan L, et al. The influence of oxalate on renal epithelial and interstitial cells. *Urological research*. 2004 Aug;32(4):304-9. PubMed PMID: 15197515.
41. Pak CY, Peterson R. Successful treatment of hyperuricosuric calcium oxalate nephrolithiasis with potassium citrate. *Arch Intern Med*. 1986 May;146(5):863-7. PubMed PMID: 3963975.
42. Pak CY, Nicar M, Northcutt C. The definition of the mechanism of hypercalciuria is necessary for the treatment of recurrent stone formers. *Contrib Nephrol*. 1982;33:136-51. PubMed PMID: 6749417.
43. Zerwekh JE, Hwang TI, Poindexter J, Hill K, Wendell G, Pak CY. Modulation by calcium of the inhibitor activity of naturally occurring urinary inhibitors. *Kidney international*. 1988 May;33(5):1005-8. PubMed PMID: 3134570.
44. Riley JM, Kim H, Averch TD, Kim HJ. Effect of Magnesium on Calcium and Oxalate Ion Binding. *Journal of endourology / Endourological Society*. 2013 Sep 2. PubMed PMID: 23998358.

45. Worcester EM, Nakagawa Y, Coe FL. Glycoprotein calcium oxalate crystal growth inhibitor in urine. *Miner Electrolyte Metab.* 1987;13(4):267-72. PubMed PMID: 3306319.
46. Nakagawa Y, Ahmed M, Hall SL, Deganello S, Coe FL. Isolation from human calcium oxalate renal stones of nephrocalcin, a glycoprotein inhibitor of calcium oxalate crystal growth. Evidence that nephrocalcin from patients with calcium oxalate nephrolithiasis is deficient in gamma-carboxyglutamic acid. *J Clin Invest.* 1987 Jun;79(6):1782-7. PubMed PMID: 3584470. Pubmed Central PMCID: PMC424521.
47. Asplin J, DeGanello S, Nakagawa YN, Coe FL. Evidence that nephrocalcin and urine inhibit nucleation of calcium oxalate monohydrate crystals. *Am J Physiol.* 1991 Nov;261(5 Pt 2):F824-30. PubMed PMID: 1951713.
48. Hess B, Nakagawa Y, Parks JH, Coe FL. Molecular abnormality of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis. *Am J Physiol.* 1991 Apr;260(4 Pt 2):F569-78. PubMed PMID: 2012207.
49. Hess B. The role of Tamm-Horsfall glycoprotein and Nephrocalcin in calcium oxalate monohydrate crystallization processes. *Scanning Microsc.* 1991 Sep;5(3):689-95; discussion 96. PubMed PMID: 1808706.
50. Shiraga H, Min W, VanDusen WJ, et al. Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jan 1;89(1):426-30. PubMed PMID: 1729712. Pubmed Central PMCID: PMC48250.
51. Wilson DM. Clinical and laboratory approaches for evaluation of nephrolithiasis. *The Journal of urology.* 1989 Mar;141(3 Pt 2):770-4. PubMed PMID: 2918617.
52. Moreira DM, Friedlander JI, Hartman C, Elsamra SE, Smith AD, Okeke Z. Using 24-hour urinalysis to predict stone type. *The Journal of urology.* 2013 Dec;190(6):2106-11. PubMed PMID: 23764079.
53. Bushinsky DA. Nephrolithiasis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 1998 May;9(5):917-24. PubMed PMID: 9596092.

54. Halabe A, Sperling O. Uric acid nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab.* 1994;20(6):424-31. PubMed PMID: 7783706.
55. Asplin JR. Uric acid stones. *Semin Nephrol.* 1996 Sep;16(5):412-24. PubMed PMID: 8890397.
56. Nakagawa Y, Asplin JR, Goldfarb DS, Parks JH, Coe FL. Clinical use of cystine supersaturation measurements. *The Journal of urology.* 2000 Nov;164(5):1481-5. PubMed PMID: 11025687.
57. Marshall RW, Robertson WG. Nomograms for the estimation of the saturation of urine with calcium oxalate, calcium phosphate, magnesium ammonium phosphate, uric acid, sodium acid urate, ammonium acid urate and cystine. *Clin Chim Acta.* 1976 Oct 15;72(2):253-60. PubMed PMID: 975580.
58. Pak CY, Sakhaee K, Moe OW, et al. Defining hypercalciuria in nephrolithiasis. *Kidney international.* 2011 Oct;80(7):777-82. PubMed PMID: 21775970. Pubmed Central PMCID: PMC4354881.
59. Pak CY, Odvina CV, Pearle MS, et al. Effect of dietary modification on urinary stone risk factors. *Kidney international.* 2005 Nov;68(5):2264-73. PubMed PMID: 16221228.
60. Kuo RL, Lingeman JE, Evan AP, et al. Urine calcium and volume predict coverage of renal papilla by Randall's plaque. *Kidney international.* 2003 Dec;64(6):2150-4. PubMed PMID: 14633137.
61. Kuo RL, Lingeman JE, Evan AP, et al. Endoscopic renal papillary biopsies: a tissue retrieval technique for histological studies in patients with nephrolithiasis. *The Journal of urology.* 2003 Dec;170(6 Pt 1):2186-9. PubMed PMID: 14634375.
62. Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, et al. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(5):607-16. PubMed PMID: 12618515. Pubmed Central PMCID: PMC151900.

63. Pak CY, Oata M, Lawrence EC, Snyder W. The hypercalciurias. Causes, parathyroid functions, and diagnostic criteria. *J Clin Invest.* 1974 Aug;54(2):387-400. PubMed PMID: 4367891. Pubmed Central PMCID: PMC301566.
64. Hoppe B, Beck BB, Milliner DS. The primary hyperoxalurias. *Kidney international.* 2009 Jun;75(12):1264-71. PubMed PMID: 19225556. Pubmed Central PMCID: PMC4577278.
65. Suhasini G, Tahiliani R, Menon PS. Hypercalcaemia. *J Assoc Physicians India.* 1986 Oct;34(10):731-2. PubMed PMID: 3818524.
66. Jenkins AD, Dousa TP, Smith LH. Transport of citrate across renal brush border membrane: effects of dietary acid and alkali loading. *Am J Physiol.* 1985 Oct;249(4 Pt 2):F590-5. PubMed PMID: 2996368.
67. Caruana RJ, Buckalew VM, Jr. The syndrome of distal (type 1) renal tubular acidosis. Clinical and laboratory findings in 58 cases. *Medicine (Baltimore).* 1988 Mar;67(2):84-99. PubMed PMID: 3127650.
68. Miyazawa K, Aihara K, Ikeda R, Moriyama MT, Suzuki K. cDNA macroarray analysis of genes in renal epithelial cells exposed to calcium oxalate crystals. *Urological research.* 2009 Feb;37(1):27-33. PubMed PMID: 19066878.
69. Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, et al. Global analysis of differentially expressed genes during progression of calcium oxalate nephrolithiasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 23;296(3):544-52. PubMed PMID: 12176015.
70. Khan SR. Reactive oxygen species, inflammation and calcium oxalate nephrolithiasis. *Transl Androl Urol.* 2014 Sep 1;3(3):256-76. PubMed PMID: 25383321. Pubmed Central PMCID: PMC4220551.
71. Taguchi K, Okada A, Yasui T, et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferator activated receptor gamma agonist, decreases renal crystal deposition, oxidative stress and inflammation in hyperoxaluric rats. *The Journal of urology.* 2012 Sep;188(3):1002-11. PubMed PMID: 22819112.
72. Liu J, Cao Z, Zhang Z, Zhou S, Ye Z. A comparative study on several models of experimental renal calcium oxalate stones formation in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2007 Feb;27(1):83-7. PubMed PMID: 17393118.

73. Lu Y, Bonny O. [Oxalate: a poorly soluble organic waste with consequences]. *Praxis (Bern 1994)*. 2015 Mar 25;104(7):353-9. PubMed PMID: 25804778.
L'oxalate: un dechet organique peu soluble, avec consequences.
74. Khan SR. Is oxidative stress, a link between nephrolithiasis and obesity, hypertension, diabetes, chronic kidney disease, metabolic syndrome? *Urological research*. 2012 Apr;40(2):95-112. PubMed PMID: 22213019.
75. Holoch PA, Tracy CR. Antioxidants and self-reported history of kidney stones: the National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of endourology / Endourological Society*. 2011 Dec;25(12):1903-8. PubMed PMID: 21864023.
76. Khan SR. Hyperoxaluria-induced oxidative stress and antioxidants for renal protection. *Urological research*. 2005 Nov;33(5):349-57. PubMed PMID: 16292585.
77. Huang HS, Chen J, Chen CF, Ma MC. Vitamin E attenuates crystal formation in rat kidneys: roles of renal tubular cell death and crystallization inhibitors. *Kidney international*. 2006 Aug;70(4):699-710. PubMed PMID: 16807540.
78. Umekawa T, Byer K, Uemura H, Khan SR. Diphenyleneiodium (DPI) reduces oxalate ion- and calcium oxalate monohydrate and brushite crystal-induced upregulation of MCP-1 in NRK 52E cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2005 May;20(5):870-8. PubMed PMID: 15755756.
79. Hong SH, Lee HJ, Sohn EJ, et al. Anti-nephrolithic potential of resveratrol via inhibition of ROS, MCP-1, hyaluronan and osteopontin in vitro and in vivo. *Pharmacol Rep*. 2013;65(4):970-9. PubMed PMID: 24145091.
80. Khan SR, Kok DJ. Modulators of urinary stone formation. *Front Biosci*. 2004 May 1;9:1450-82. PubMed PMID: 14977559.
81. Yu XQ, Wu LL, Huang XR, et al. Osteopontin expression in progressive renal injury in remnant kidney: role of angiotensin II. *Kidney international*. 2000 Oct;58(4):1469-80. PubMed PMID: 11012882.

82. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*. 1996 Jan 26;271(5248):509-12. PubMed PMID: 8560266.
83. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of pineal research*. 1995 Jan;18(1):1-11. PubMed PMID: 7776173.
84. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*. 1997 Aug;29(8):363-72. PubMed PMID: 9288572.
85. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin--an emerging mystery. *Biochem Pharmacol*. 1998 Nov 15;56(10):1265-72. PubMed PMID: 9825724.
86. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci*. 1994;55(15):PL271-6. PubMed PMID: 7934611.
87. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci*. 2000 Nov-Dec;7(6):444-58. PubMed PMID: 11060493.
88. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*. 1995 Apr;9(7):526-33. PubMed PMID: 7737461.
89. Beutler E, Gelbart T. Improved assay of the enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase. *Clin Chim Acta*. 1986 Jul 15;158(1):115-23. PubMed PMID: 2874903.
90. Mylroie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986 Mar 15;82(3):512-20. PubMed PMID: 3952734.
91. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10. PubMed PMID: 672633.

92. Hillegass LM, Griswold DE, Brickson B, Albrightson-Winslow C. Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *J Pharmacol Methods*. 1990 Dec;24(4):285-95. PubMed PMID: 1963456.
93. Rushton HG, Spector M, Rodgers AL, Hughson M, Magura CE. Developmental aspects of calcium oxalate tubular deposits and calculi induced in rat kidneys. *Investigative urology*. 1981 Jul;19(1):52-7. PubMed PMID: 7251328.
94. Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR. Lipid peroxidation in ethylene glycol induced hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis. *The Journal of urology*. 1997 Mar;157(3):1059-63. PubMed PMID: 9072543.
95. Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yegen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Journal of pineal research*. 2002 Mar;32(2):120-6. PubMed PMID: 12071469.
96. Sener G, Satiroglu H, Kabasakal L, et al. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol*. 2000 Nov-Dec;14(6):553-60. PubMed PMID: 11206705.
97. Sener G, Paskaloglu K, Toklu H, et al. Melatonin ameliorates chronic renal failure-induced oxidative organ damage in rats. *Journal of pineal research*. 2004 May;36(4):232-41. PubMed PMID: 15066047.
98. Ersahin M, Sehirli O, Toklu HZ, et al. Melatonin improves cardiovascular function and ameliorates renal, cardiac and cerebral damage in rats with renovascular hypertension. *Journal of pineal research*. 2009 Aug;47(1):97-106. PubMed PMID: 19549002.
99. Selvam R. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. *Urological research*. 2002 Mar;30(1):35-47. PubMed PMID: 11942324.
100. Ozturk H, Ozturk H, Yagmur Y, Buyukbayram H. The effect of L-arginine methyl ester on indices of free radical involvement in a rat model of experimental nephrocalcinosis. *Urological research*. 2006 Oct;34(5):305-14. PubMed PMID: 16823549.


101. Malle E, Buch T, Grone HJ. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney international*. 2003 Dec;64(6):1956-67. PubMed PMID: 14633118.
102. Sener G, Tugtepe H, Yuksel M, Cetinel S, Gedik N, Yegen BC. Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Archives of medical research*. 2006 Oct;37(7):822-9. PubMed PMID: 16971220.
103. Sener G, Sehirli O, Velioglu-Ogunc A, et al. Montelukast protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2006 Jul;54(1):65-71. PubMed PMID: 16584888.
104. Odobasic D, Kitching AR, Semple TJ, Holdsworth SR. Endogenous myeloperoxidase promotes neutrophil-mediated renal injury, but attenuates T cell immunity inducing crescentic glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007 Mar;18(3):760-70. PubMed PMID: 17267745.
105. Mushtaq S, Siddiqui AA, Naqvi ZA, et al. Identification of myeloperoxidase, alpha-defensin and calgranulin in calcium oxalate renal stones. *Clin Chim Acta*. 2007 Sep;384(1-2):41-7. PubMed PMID: 17610860.
106. Thamilselvan S, Khan SR, Menon M. Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants. *Urological research*. 2003 Mar;31(1):3-9. PubMed PMID: 12624656.
107. Khan SR, Byer KJ, Thamilselvan S, et al. Crystal-cell interaction and apoptosis in oxalate-associated injury of renal epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1999 Nov;10 Suppl 14:S457-63. PubMed PMID: 10541283.
108. Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue-culture studies. *Clin Exp Nephrol*. 2004 Jun;8(2):75-88. PubMed PMID: 15235923.
109. Eberhardt W, Beeg T, Beck KF, et al. Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney international*. 2000 Jan;57(1):59-69. PubMed PMID: 10620188.

110. Tan TK, Zheng G, Hsu TT, et al. Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage. *Lab Invest.* 2013 Apr;93(4):434-49. PubMed PMID: 23358111.
111. Khan SR, Canales BK. Unified theory on the pathogenesis of Randall's plaques and plugs. *Urolithiasis.* 2015 Jan;43 Suppl 1:109-23. PubMed PMID: 25119506. Pubmed Central PMCID: PMC4373525.
112. Esposito T, Rendina D, Aloia A, et al. The melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene is associated with recurrent and idiopathic calcium nephrolithiasis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2012 Jan;27(1):210-8. PubMed PMID: 21652546.

8. EKLER

8.1. Ek 1. Etik Kurul Onayı

91



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	40.2015.mar	ÇALIŞMA: Uzmanlık Tezi		
	PROJE ADI	Deneysel Üriner Sistem Taş Hastalığı Modelinde Melatonin'in Koruyucu Etkileri			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Prof. Dr. Cem AKBAL			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER			
	DESTEKLEYİCİ	BAPKO			
KARAR BİLGİLERİ	TARİH: 21.05.2015 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek projenin yenilenmesi gerekmektedir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.				
ÜYELER					
Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	Araştırıcı
Prof.Dr. İnci ALICAN	Fizyoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkan Yrd.	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet.Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Dilek KÖKTÜRK	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	

8.2. Özgeçmiş

8.2.1. Kişisel Bilgiler

İsim, Soyisim: Tarık Emre ŞENER

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul, 17.10.1985

Medeni Durumu: Evli

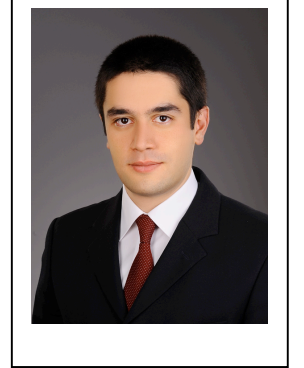
İkamet Adresi: Acıbadem Mahallesi Çeçen Sokak, Almondhill Konutları B8 blok
Daire:6 Üsküdar İstanbul Türkiye 34660

İletişim Bilgileri:

Ev tel.: +90 216 690 30 63

Cep tel.: +90 533 762 07 12

E-mail: dr.emresener@gmail.com



8.2.2. Öğrenim bilgileri

Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı	2011-2016
Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi	2004-2010
Lycée Saint Joseph, İstanbul	2000-2004
Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi	1996-2000

8.2.3. Klinik rotasyonlar

Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Temmuz 2005, İstanbul, Türkiye

Le Centre Chirurgical Marie Lannelongue 133 avenue de la résistance 92350 Le Plessis Robinson Paris, Pediatrik Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Konjenital Kalp Hastalıkları Bilim Dalı, 1-24 Ağustos 2007, Paris, Fransa

University of South Carolina School of Medicine Columbia, SC 29208, Romatoloji Anabilim Dalı, 27 Haziran – 4 Temmuz 2008, Amerika Birleşik Devletleri

University of South Carolina School of Medicine Columbia, SC 29208, Endokrinoloji Anabilim Dalı, 6 Temmuz – 7 Ağustos 2008, Amerika Birleşik Devletleri

Marie and Pierre Curie University, Tenon Hospital, Üroloji Anabilim Dalı, 1 Kasım 2014 – 31 Ocak 2015, Paris, Fransa

8.2.4. Uluslararası makaleler

1. Sener G, **Sener E**, Sehirli O, Oğünç AV, Cetinel S, Gedik N, Sakarcan A. Ginkgo biloba extract ameliorates ischemia reperfusion-induced renal injury in rats. *Pharmacol Res.* 52(3): 216-22, 2005.
2. Şener G, Sakarcan A, Sehirli O, Eksioğlu Demiralp E, **Sener E**, Ercan F, Gedik N, Yegen BC. Chronic renal failure-induced multiple-organ injury in rats is alleviated by the selective CysLT1 receptor antagonist montelukast. *Prostaglandins and Other Lipid Mediat*, 83(4): 257-267, 2007.
3. Sehirli O, **Sener E**, Cetinel S, Yuksel M, Gedik N, Sener G. Alpha-lipoic acid protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35(3):249-55, 2008.
4. Sehirli O, **Sener E**, Sener G, Cetinel S, Erzik C, Yeğen BC. Ghrelin improves burn-induced multiple organ injury by depressing neutrophil infiltration and the release of pro-inflammatory cytokines. *Peptides.* 29: 1231-40, 2008.
5. Cetinel S, Hancıoğlu S, **Sener E**, Uner C, Kiliç M, Sener G, Yeğen BC . Oxytocin treatment alleviates stress-aggravated colitis by a receptor-dependent mechanism. *Regul Pept.* 160(1-3): 146-52, 2010.
6. Çakır T, Özkan E, Dulundu E, Topaloğlu Ü, Şehirli AÖ, Ercan F, **Şener E**, Şener G. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Prevents Methotrexate-Induced Hepatorenal Oxidative Injury in Rats. *J Pharm Pharmacol* 63(12): 1566-71, 2011.
7. Cevik O, Oba R, Macit C, Cetinel S, Kaya OT, **Sener E**, Sener G. Lycopene inhibits caspase-3 activity and reduces oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns.* 38(6): 861-71, 2012.
8. Cevik O, Erşahin M, **Sener TE**, Tinay I, Tarcan T, Cetinel S, Sener A, Toklu HZ, Sener G. Beneficial effects of quercetin on rat urinary bladder after spinal cord injury. *J Surg Res* 183(2):695-703, 2013.

9. **Şener TE**, Kardaş RC, Şehirli AÖ, Ekşioğlu-Demiral M, Yüksel M, Çetinel Ş, Yeğen BC, Şener G. The effect of betulinic acid on TNBS-induced experimental colitis. *Marmara Pharm J.* 17: 52-59, 2013.
10. Cevik O, Cadirci S, **Sener TE**, Tinay I, Akbal C, Tavukçu HH, Cetinel S, Kıran D, Sener G. Quercetin treatment against ischemia/reperfusion injury in rat corpus cavernosum tissue: role on apoptosis and oxidative stress. *Free Radic Res.* 2013;47(9):683-91.
11. Akbal C, Sahan A, **Sener TE**, Sahin B, Tinay I, Tarcan T, Simsek F. Diagnostic value of the pediatric lower urinary tract symptom score in children with overactive bladder. *World J Urol.* DOI 10.1007/s00345-013-1224-y.
12. Tavukcu HH, **Sener TE**, Tinay I, Akbal C, Ersahin M, Cevik O, Cadirci S, Reiter RJ, Sener G. Melatonin and tadalafil treatment improves erectile dysfunction after spinal cord injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2014 Apr; 41(4): 309-16. Doi: 10.1111/1440-1681.12216.
13. **Sener TE**, Yuksel M, Ozyilmaz-Yay N, Ercan F, Akbal C, Simsek F, Sener G. Apocynin attenuates testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg.* 2014 Nov 20. Pii: S0022-3468(14)00777-5. Doi: 10.1016/j.pedsurg.2014.11.033. [Epub ahead of print].
14. **Sener TE**, Cloutier J, Audouin M, Villa L, Traxer O. A guidewire introducer as a ureteral foreign body: A case report. *Can Urol Assoc J.* 2015 May-Jun;9(5-6):E384-6. doi: 10.5489/cuaj.2626.
15. Sekerci CA, Akbal C, **Sener TE**, Sahan A, Sahin B, Baltacioglu F, Simsek F. Resistant pediatric priapism: A real challenge for the urologist. *Can Urol Assoc J* 2015;9(7-8):E562-4. <http://dx.doi.org/10.5489/cuaj.2952> Published online August 10, 2015.
16. **Sener TE**, Cloutier J, Villa L, Marson F, Buttice S, Doizi S, Traxer O. Can We Provide Low Intrarenal Pressures with Good Irrigation Flow by Decreasing the Size of Ureteral Access Sheaths? *J Endourol.* 2015 Sep 18. [Epub ahead of print].

8.2.5. Ulusal makaleler

1. Şehirli Ö, Ünlü B, Çetinel Ş, Tetik Ş, **Şener E**, Şener G. Etanercept protects remote organ damage in a rat model of thermal injury. Marmara Pharmaceutical Journal 15: 118-124, 2011
2. **Şener TE**, Tarcan T. Spinal kord hasarı ve alt üriner system işlev bozuklukları. Kadın ve işlevsel Üroloji Bülteni. 2(3): 5-12, 2012
3. **Şener TE**, Tarcan T. Aşırı aktif mesane: Aferent yolun değişen yüzü. Kadın ve işlevsel Üroloji Bülteni. Cilt 3, Sayı 1, 2013



8.2.6. Uluslararası bildiriler

1. Şehirli AO, **Şener E**, Şener G, Gedik N, Yegen BC. Ghrelin treatment protects against burn-induced pulmonary and gastric oxidative injury in rats. PC494, Life Sciences 2007, A joint meeting of the Biochemical Society, the British Pharmacological Society and the Physiological Society, 9-12 July 2007, Glaskow, UK
2. Hancıoğlu S, Üner C, **Şener E**, Kılıç M, Çetinel Ş, Şener G, Yeğen B. Stres ortamında gelişen kolitte oksitosin tedavisinin etkisi. (P17), Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 33. Ulusal Kongresi, 15-19 Ekim 2007, Girne-Kıbrıs
3. Şehirli AÖ, **Şener E**, Şener G, Erzik C, Çetinel Ş, Gedik N, Yeğen BC. Yanığa bağlı gelişen cilt ve uzak organ hasarında ghrelinin koruyucu etkisi. (P18). Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 33. Ulusal Kongresi, 15-19 Ekim 2007, Girne-Kıbrıs
4. Şehirli AÖ, Şener G, **Şener E**, Kardaş R, Demiralp E, Yeğen BÇ. Betulinic Acid Treatment Ameliorates Oxidative Colonic Injury In Rats Via Its Antioxidant Activity. Digestive Disease Week, 17-20 May, 2008, San Diego, USA
5. Hancıoğlu S, **Şener E**, Üner C, Kılıç M, Çetinel Ş, Şener G, Yeğen BÇ. Oxytocin Treatment Alleviates Stress-Aggravated Colitis by a Receptor-Dependent Mechanism. 17-20 May, 2008, San Diego, USA
6. Tasar N, Şehirli Ö, Yiğiner Ö, Çetinel S, Yegen BC, **Şener E**, Şener G. Nigella Sativa treatment ameliorates cardiac and cerebral injury in hypertensive rats. Abstract book p. 34, The 2nd International Symposium on Medicinal Plants, Their Cultivation and Aspects of Uses. 3-4 November, 2010, Petra, Jordan
7. Akbal C, Top T, Sahan A, **Sener TE**, Akgul M, Tarcan T, Simsek F. Voiding dysfunction symptom score questionnaire (vdssq)'s role in evaluation and treatment of children with urinary incontinence. EAU 8th South Eastern European Meeting (SEEM 8). 2012, Sofia, Bulgaria

8. **Sener TE**, Top T, Tinay I, Turkeri L. Preliminary results of abiraterone acetate treatment in patients with castration resistant prostate cancer. EAU 8th South Eastern European Meeting (SEEM 8). 2012, Sofia, Bulgaria
9. **Sener TE**, Tinay I, Turkeri L. Oncological and pathological results after nephron sparing surgery in patients with renal masses. EAU 8th South Eastern European Meeting (SEEM 8). 2012, Sofia, Bulgaria
10. **Sener TE**, Sulukaya M, Tinay I, Turkeri L. Does the mass size of nephron sparing surgery (NSS) provide additional information for the prediction of benign lesions? EAU 9th South Eastern European Meeting (SEEM 9). 2013, Thessaloniki, Greece
11. Tinay I, Temiz Y, Ilker Y, Tuglular S, Turkeri L, **Sener TE**. An alternative for short renal vein during kidney transplantation: Long-term experience with Polyethylene Terephthalate (Dacron) Vascular Graft. EAU 9th South Eastern European Meeting (SEEM 9). 2013, Thessaloniki, Greece
12. Akbal C, Top T, **Sener E**, Sahan A, Bayri, Y, Tanrikulu B, Simsek F, Tarcan T. Intractable voiding dysfunction and high pressure bladder: evaluation of patients with normal and abnormal spinal imaging. International Continence Society, 26-30 August 2013, Barcelona, Spain
13. **Sener TE**, Akbal C, Sahan A, Bayri Y, Tanrikulu B, Tinay I, Tarcan T, Simsek F. Urinary tract status in pediatric patients with treatment-resistant bladder sphincter dysfunction: Does diagnosis of tethered cord syndrome help to preserve the kidneys? 25th Congress of the ESPU, 7-10 May 2014, Innsbruck, Austria
14. Akbal C, Sahan A, **Sener TE**, Sahin B, Tinay I, Tarcan T, Simsek F. Diagnostic value of the Pediatric Lower Urinary Tract Symptom Score in children with overactive bladder. 25th Congress of the ESPU, 7-10 May 2014, Innsbruck, Austria
15. **Sener TE**, Yakinci OF, Yuksel M, Ozyilmaz-Yay N, Ercan F, Akbal C, Simsek F, Sener G. Apocynin attenuates testicular ischemia-reperfusion injury in rats: Morphological and biochemical study. 18th International Microscopy Congress, 7-12 September 2014, Prague

16. **Sener TE**, Yakinci OF, Yuksel M, Ozyilmaz-Yay N, Ercan F, Akbal C, Simsek F, Sener G. Apocynin attenuates testicular ischemia-reperfusion injury in rats. III World Congress of Public Health Nutrition, November 2014, Las Palmas de Gran Canaria, Spain
17. Tanidir Y, Garayev A, Sahan A, **Sener TE**, Tinay I, Sekerci CA, Akbal C, Simsek F. Hounsfield unit has the ability to predict positive stone culture prior to percutaneous nephrolithotomy. EAU 15, 20-24 March 2015, Madrid, Spain
18. **Sener TE**, Cloutier J, Villa L, Marson F, Buttice S, Doizi S, Traxer O. Can We Provide Low Intrarenal Pressures with Good Irrigation Flow by Decreasing the Size of Ureteral Access Sheaths? 5th International Meeting of Challenges in Endourology, 28-30 June 2015, Paris, France
19. **Sener TE**, Cloutier J, Villa L, Marson F, Buttice S, Doizi S, Traxer O. Can We Provide Low Intrarenal Pressures with Good Irrigation Flow by Decreasing the Size of Ureteral Access Sheaths? The Endourological Society's World Congress of Endourology, 1-4 October 2015, ExCeL, London, United Kingdom

8.2.7. Ulusal bildiriler

1. Şehirli Ö, Akakın D, **Şener E**, Şener G, Çetinel Ş, Yegen B. Deneysel yanık modelinde ghrelinin mide üzerindeki etkisi: ışık ve taramalı elektron mikroskopik çalışma. XVIII. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. 26-29 Ağustos 2007, Eskişehir
2. Şehirli AÖ, Çetinel Ş, Tetik Ş, Kökeş A, **Şener E**, Dülger G. Safra kanalı ligasyonu ile oluşturulan hepatit modelinde spironalaktonun antiinflamatuvar etkisinin incelenmesi. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 19-22 ekim 2011, Eskişehir
3. Şener G, Erşahin M, Çevik Ö, Şener A, Toklu H, Özçelik R, **Şener E**, Tinay İ, Tarcan T. Deneysel omurilik yaralanmasında quersetinin omurilik ve mesane üzerinde olası koruyucu etkilerinin araştırılması. 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 25-29 Eylül 2012, Trabzon
4. **Şener TE**, Top T, Tinay I, Turkeri L. Kastrasyona dirençli prostat kanseri hastalarında Abirateron Asetat tedavisinin erken dönem sonuçları. 1. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, 3-7 Ekim 2012, Antalya
5. **Sener TE**, Tinay I, Turkeri L. Renal kitlesi olan hastalarda Nefron Koruyucu Cerrahi sonrası Onkolojik ve Patolojik sonuçlar. 1. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, 3-7 Ekim 2012, Antalya
6. Akbal C, Top T, Sahan A, **Sener TE**, Akgul M, Tarcan T, Simsek F. İdrar kaçırması olan çocukların değerlendirilmesi ve tedavisinde İşeme Bozuklukları Semptom Skorunun yeri. 1. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, 3-7 Ekim 2012, Antalya
7. **Şener TE**. Non-nörojenik Nörojenik Mesane: Tedavide neredeyiz? Türk Çocuk Ürolojisi Derneği İstanbul Toplantıları. 12 Şubat 2013
8. **Şener TE**, Tinay İ, Tarcan T, Çevik Ö, Erşahin M, Çaldırcı S, Çetinel Ş, Şener G. Spinal kord hasarı sonrasında kuersetinin sıçan mesane dokusu üzerinde

- koruyucu etkileri. 3. Ulusal İşlevsel Üroloji ve Kadın Ürolojisi Kongresi, 3-6 Ekim 2013, Mardan Palace Kongre Merkezi, Antalya
9. **Şener TE**, Tinay İ, Tarcan T, Çevik Ö, Çaldırcı S, Çetinel Ş, Şener G. Sıçanlarda iskemi/reperfüzyon modelinde oluşan mesane dokusu kontraktıl bozukluğu ve apoptoz üzerine kuersetinin etkileri. 3. Ulusal İşlevsel Üroloji ve Kadın Ürolojisi Kongresi, 3-6 Ekim 2013, Mardan Palace Kongre Merkezi, Antalya
10. **Şener TE**, Sulukaya M, Mangır N, Akgul M, Tinay İ, Türkeri L. Nefron koruyucu cerrahide kitle boyutu benign lezyonları öngörme konusunda ek bilgi sağlar mı? 11. Üroonkoloji Kongresi, 6-10 Kasım 2013, Cornelia Diamond Otel, Belek, Antalya
11. Akgul M, Sulukaya M, Baykan Ö, Şahan A, **Şener TE**, Tinay İ, Türkeri L. Prostat kanserinde tiroid hormonlarının rolü. 11. Üroonkoloji Kongresi, 6-10 Kasım 2013, Cornelia Diamond Otel, Belek, Antalya
12. **Şener TE**, Akbal C, Şahan A, Top T, Bayrı Y, Tanrıkuu B, Tinay İ, Şimşek F, Tarcan T. Tedaviye yanıtız alt üriner sistem disfonksiyonu olan hastaların uzun dönem takip sonuçları: Gergin kord malformasyonunun morbiditeye etkisi var mı? 12. Türk Çocuk Ürolojisi Kongresi, 22-24 Kasım 2013, Titanic Beach Lara, Antalya
13. Akbal C, Şahan A, **Şener TE**, Şahin B, Tinay İ, Tarcan T, Şimşek F. Aşırı aktif mesanesi olan çocuklarda pediatrik alt üriner sistem semptom skorunun tanısıl değeri. 12. Türk Çocuk Ürolojisi Kongresi, 22-24 Kasım 2013, Titanic Beach Lara, Antalya
14. Sahin M, **Sener E**, Tavukcu H, Tinay I, Akbal C, Cevik O, Cadirci S, Sener G. Tadalafil'in sıçanlarda spinal kord yaralanması sonucunda; Spinal kord, mesane ve böbrek hasarları üzerine olan etkilerinin araştırılması. Türk Nöroşirürji Derneği, 28. Bilimsel Kongresi, 4-8 Nisan 2014, Rixos Sungate Hotel & Kongre Merkezi, Beldibi, Antalya

15. Sahin M, **Sener E**, Tavukcu H, Tinay I, Akbal C, Cevik O, Cadirci S, Sener G. Melatonin Ve Tadalafil'in Sıçanlarda Spinal Kord Yaralanması Sonucunda Oluşan Eretil Disfonksiyon Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması. Türk Nöroşirürji Derneği, 28. Bilimsel Kongresi, 4-8 Nisan 2014, Rixos Sungate Hotel & Kongre Merkezi, Beldibi, Antalya
16. Sahin B, **Sener TE**, Tinay I, Turkeri NL. Testiküler seminoma tanılı hastaların evrelendirilmesinde fluorodeoxyglucose-pozitron emisyon tomografisi (FDG-PET). 2. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, 05-09 Kasım 2014, Antalya
17. Sekerci CA, Akbal C, **Sener TE**, Sahan A, Tarcan T, Simsek F. Cocuklarda palpe edilemeyen testisin değerlendirilmesinde kontralateral testis boyutunun önemi. 2. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, 05-09 Kasım 2014, Antalya
18. Asutay MK, **Sener TE**, Top T, Tinay I, Turkeri NL. Metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri hastalarında Abirateron Asetat tedavisi sonuçları: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroonkoloji Kliniği deneyimi. 2. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, 05-09 Kasım 2014, Antalya
19. **Sener TE**, Yuksel M, Ozyılmaz N, Ercan F, Akbal C, Simsek F, Sener G. Sıçanlarda testiküler iskemi-reperfüzyon hasarında Aposinin'in rolü. 2. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, 05-09 Kasım 2014, Antalya
20. Tavukcu HH, **Sener TE**, Tinay I, Akbal C, Ersahin M, Cevik O, Sener G. Spinal kord hasarına bağlı olarak gelişen erektile disfonksiyonda Melatonin ve Tadalafil'in etkileri. 2. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, 05-09 Kasım 2014, Antalya
21. Tanıdır Y, Tinay İ, **Şener TE**, Allahverdiyev E, Şimşek F. Laparoskopik Radikal Sistektomi: Başlangıç Tecrübemiz. 12. Üroonkoloji Kongresi 18-22 Kasım 2015, Sueno Deluxe Otel, Belek, Antalya
22. Tinay İ, Tanıdır Y, **Şener TE**, Allahverdiyev E, HK Çam. Bilateral Senkron Testiküler Kanser: Onko-TESE vaka sunumu. 12. Üroonkoloji Kongresi 18-22 Kasım 2015, Sueno Deluxe Otel, Belek, Antalya

23. Şahin B, Şener TE, Halil S, Tanıdır Y, Yumuk F, Türkeri NL, Tinay İ. Testis Tümörü Nedeni İle Kemoterapi Uygulanan Hastalarda Tedavi Öncesi Nötrofil/Lenfosit Oranının Sonuçlara Etkisi. 12. Üroonkoloji Kongresi 18-22 Kasım 2015, Sueno Deluxe Otel, Belek, Antalya



